FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GENERALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N° 6

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES
PYROPHOSPHATASES DES TISSUS ANIMAUX

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le 1943

PAR

Jacqueline DURAND
née le 30 Mai 1917. à Orange (Vaucluse)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse { MM. J. ROCHE, *Professeur, Président.*
NICLOUX, *Prof. Fac. Méd. Strasbourg.*
DUBOULOZ. *Professeur.*
DERRIEN, *Chargé des fonct. d'agrégé.* } *Assesseurs.*

MAURICE DECLUME
IMPRIMEUR - ÉDITEUR
LONS-LE-SAUNIER
1943

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GENERALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE N°

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES
PYROPHOSPHATASES DES TISSUS ANIMAUX

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le 1943

PAR

Jacqueline DURAND
née le 30 Mai 1917. à Orange (Vaucluse)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse : MM. J. ROCHE, *Professeur, Président.*
NICLOUX, *Prof. Fac. Méd. Strasbourg.*
DUBOULOZ, *Professeur.*
DERRIEN, *Chargé des fonct. d'agrégé.*
} *Assesseurs.*

MAURICE DECLUME
IMPRIMEUR - ÉDITEUR
LONS-LE-SAUNIER
1943

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PERSONNEL DE LA FACULTÉ MIXTE

DE

MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : Lucien CORNIL — *Assesseur :* F. MERCIER

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MOITESSIER, CASSOUTE
OLMER, GAUJOUX, COTTE, AUBARET

Chargé de cours honoraire : TIAN.

Secrétaire : J. COMTE — *Bibliothécaire :* Mme PEROL.

Professeurs :

Anatomie	N...
Anatomie pathologique et Pathologie expérimentale	CORNIL
Bactériologie	ROUSLACROIX
Chimie analytique et hydrologie	RIMATTEI
Chimie médicale	ROCHE
Clinique chirurgicale	FIOLLE
Clinique chirurgicale	BOURDE
Clinique exotique	HECKENROTH
Clinique des maladies nerveuses	ROGER
Clinique médicale	AUDIBERT
Clinique médicale	MONGES
Clinique médicale	MATTEI
Clinique médicale infantile	GIRAUD
Clinique obstétricale	VAYSSIÈRE
Clinique ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	BREMOND
Clinique urologique	CHAUVIN
Histoire naturelle	N...
Histologie	ROMIEU
Hygiène générale et coloniale	VIOLLE
Médecine légale	MOSINGER
Parasitologie	JOYEUX
Pathologie chirurgicale	MOIROUD
Pharmacodynamie et matière médicale	MERCIER
Pharmacie	VIGNOLI
Physiologie	MORIN
Physique	CHEVALLIER
Thérapeutique	POINSO
Professeur sans chaire	POURSINES
Professeur sans chaire	DUBOULOZ
Professeur sans chaire	SAUTET

Chargés de cours :

Clinique dermatologique ..... VIGNE
Hydrologie clinique et thérapeutique ..... PIERI

Agrégés en exercice :

MM. BERTHIER	MM. CHOSSON	MM. AUDIER
BALANSARD	DELPHAUT	DOR
BRAHIC	R. IMBERT.	RECORDIER
FIGARELLA	PAILLAS	SALMON
ARNOUX		

Chargés des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale ..... DERRIEN
Physiologie ..... DONNET
Physique ..... ROUX

Chargés de Cours complémentaires :

Anatomie descriptive et topographique ..... SALMON
Chimie minérale ..... ARNOUX
Chimie organique ..... DUMAZERT
Clinique de la tuberculose ..... BERTHIER
Clinique des maladies contagieuses ..... PERIOT
Clinique chirurgicale infantile ..... R. IMBERT
Clinique stomatologique ..... ACHARD
Clinique gynécologique ..... FIGARELLA
Médecine opératoire ..... DOR
Microbiologie (Pharmacie) ..... BOYER
Neuro-Chirurgie ..... ARNAUD
Obstétrique ..... CHOSSON
Pharmacodynamie (Pharmacie) ..... DELPHAUT
Psychiatrie ..... ALLIEZ
Toxicologie ..... GUILLOT

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

avec toute mon affection.

A MON MAÎTRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN ROCHE

MEMBRE CORRESPONDANT A L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

avec ma très profonde reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. NICLOUX

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'INSTITUT DE FRANCE

MEMBRE ASSOCIÉ DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

A MON JURY DE THÈSE

A Monsieur Nguyen-van THOAI

en témoignage de reconnaissance et de sincère amitié.

ET A MES CAMARADES DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547003_0093

PREMIÈRE PARTIE.

INTRODUCTION.

I. — LES PYROPHOSPHATASES DANS LE CADRE GÉNÉRAL DES PHOSPHATASES.

De nombreuses et importantes réactions biochimiques : dégradation des sucres, absorption et transport des lipides, calcification des os, sont catalysées par des enzymes, les phosphatases, que l'on fait souvent rentrer dans le grand groupe des estérases parce que la plupart d'entre eux libèrent de l'acide phosphorique à partir d'esters de celui-ci.

En réalité, la liaison phosphore-oxygène des esters phosphoriques ne présente que des analogies éloignées avec la liaison carbone-oxygène des esters organiques, et par ailleurs certains esters phosphoriques ne sont pas hydrolysables. Aussi vaut-il mieux admettre que les phosphatases constituent une classe particulière d'enzymes.

Par la suite, on a étendu ce nom, non seulement à tous les enzymes hydrolysant les esters phosphoriques, mais également à ceux libérant de l'acide phosphorique à partir de corps très divers : dérivés minéraux (métaphosphates, pyrophosphates, triphosphates) ou organiques (phospho-amides).

Successivement Munemura [52], Oppenheimer [60], Folley et Kay [29], Albers [6] ont essayé d'en donner

une classification basée sur trois caractères principaux de ces enzymes, à savoir :

la spécificité vis-à-vis du substrat,
le pH optimum d'action,
la différence d'action des activateurs et des inhibiteurs.

A. — Spécificité de substrat.

La spécificité des phosphatases est-elle liée à l'influence du reste acide ou du reste alcoolique ?

1. La nature de l'alcool ne semble exercer aucune action spécifique sur l'enzyme, qui hydrolyse indifféremment les esters phosphoriques des alcools (aliphatiques ou aromatiques) et des phénols les plus variés (méthanol, éthanol, propanol, isopropanol, naphtol, bornéol, etc...) et même de certains cyclanols (acide inositoldiphosphorique) ; les esters glucidiques (monoesters phosphoriques d'hexoses de l'acide glycérique, du glycérol (Albers [6]) et leurs dérivés sont également dédoublés par un même enzyme. Dans le cas des glycérophosphates isomères l'action phosphatasique est différente suivant que l'alcool est primaire ou secondaire. C'est ainsi que la phosphomonoestérase de pH optimum = 9,0 (rein, os, intestin) hydrolyse préférentiellement le β-glycérophosphate à l'α. et celle de pH optimum = 5,4 - 6,4 (hématies, levure de bière) est plus active sur l'α-glycérophosphate que sur le β.

2. L'influence d'autres corps organiques liés aux restes phosphoriques et la nature de la liaison s'exerce également. Dans les phosphoamides, la substitution du reste amidé aux restes alcooliques ou phénoliques, détermine la spécificité de ces enzymes, car l'hydrolyse des phosphoamides paraît due à une phosphatase particulière : la phospho-amidase (Ichihara [36] et Waldschmidt-Leitz et Köhler [77]).

3. La nature du groupement acide renfermant le phosphore exerce aussi une influence sur la spécificité des phosphatases. Ainsi les divers dérivés phosphoriques suivants :

monoesters orthophosphoriques, R—CO—O—P(=O)(OH)(OH)

diesters orthophosphoriques, (R—CO—O)(R—CO—O)P(=O)(OH)

acide métaphosphorique, (HPO_3)

acide pyrophosphorique, $H_4P_2O_7$

acide triphosphorique, $H_5P_3O_{10}$

(le plus simple des acides polyphosphoriques)

sont hydrolysés chacun par des enzymes nettement spécifiques : les phosphomonoestérases, les diestérases, la métaphosphatase, les pyrophosphatases, la triphosphatase.

Dans les cinq groupes, la fonction alcool ou phénol exerce, lorsqu'elle est présente, une influence sur la vitesse de réaction, mais elle ne conditionne pas sa spécificité absolue. Le cas de l'adénylpyrophosphatase (Jacobsen [37], Barrenscheen et Lang [16], Satoh [72], Liebnecht [46]), si la spécificité de cette dernière vient à se confirmer, constitue dans le domaine des pyrophosphatases, une exception, où le reste nucléosidique semble modifier la spécificité de l'enzyme. De même la 5-nucléotidase (Reis, Gulland et Jackson [31]), hydrolyse spécifiquement l'acide adénylique du muscle et les nucléotides 5-phosphoriques, dans lesquelles l'acide phosphorique estérifie le carbone 5 du pentose.

C'est sans doute en raison de la même influence du reste phosphorique que l'hexosediphosphate et l'hexaphosphate d'inositol, dont la phytine constitue le sel calcomagnésien, requièrent pour leur déphosphorylation des enzymes spécifiques, connus respectivement sous le nom d'hexosediphosphatase (Ohmiya [59]) et de phytase (Suzuki, Yoshimura et Takaishi [73], Rappoport [61]). L'importance du reste acide se manifeste également dans la spécificité de la polynucléotidase (Klein, Lehmann-Echternacht), dont l'individualité n'est plus mise en doute, tandis que la mononucléotidase (Levene) doit être considérée comme identique aux monoestérases ordinaires. Il existe néanmoins une 5-nucléotidase spécifique, présente en abondance dans les testicules (Reiss) agissant sur les nucléotides porteurs de radical phosphorique estérifié au carbone 5 du pentose (acide adénylique du muscle).

En tenant compte de l'influence des divers constituants du substrat, on peut distinguer dans le groupe des phosphatases :

les phosphomonoestérases
les phosphodiestérases
les pyrophosphatases
les phosphoamidases
l'hexosediphosphatase
la métaphosphatase
la polyphosphatase
la polynucléotidase
la phytase
la 5-nucléotidase.

B. — pH optimum d'action.

La deuxième notion qui a permis une classification est celle de pH optimum d'action des enzymes. Munemura [52], puis Belfanti, Contardi et Ercoli [20] avaient remarqué l'existence de plusieurs zones de pH optimum

d'action pour une même préparation phosphatasique, mais c'est à Bamann [8] qu'est due la notion d'isodynamie des enzymes agissant sur les mêmes substrats à des pH optima particuliers. C'est ainsi que Folley et Kay [29] ont distingué quatre phosphomonoestérases à pH optimum d'action différents :

La phosphoestérase A_1, dite « alcaline » (Kay, Robison) à pH optimum d'action voisin de 9, (répandue surtout dans les organes animaux (os, intestin, rein, foie, cerveau).

La phosphoestérase du type A_2 dite « acide », active entre pH 4,5 et 5,5, présente dans le foie, la prostate et dans de très nombreux végétaux (Courtois [22], Giri, Pfandkuch, Ignatieff, Belfanti, Contardi et Ercoli [20], Bamann, Riedel et Diederich [8], Bamann et Salzer [14]).

La phosphoestérase du type A_3, dite « très acide » à pH optimum d'action compris entre 3,2 et 4,4 (Bamann [8, 13, 14, 12], Munemura [52]). Ces deux derniers enzymes existent dans les organismes végétaux aussi bien qu'animaux (graines, champignons, roie rein).

La phosphoestérase du type A_4, à pH optimum d'action de 6 - 6,6, signalée dans les hématies (Roche [63]) et les levures basses (Schäffner et Bauer [70], Schäffner et Krumey [71]. On verra plus loin que certains auteurs ont pensé différencier trois pyrophosphatases par leur pH optimum d'action.

C. — Activateurs et inhibiteurs.

Enfin l'action différente de divers ions minéraux ou organiques permet aussi une différenciation des enzymes isodynames, comme le montrent quelques tests suivants relatifs aux phosphomonoestérases.

L'ion Mg^{++} a été de beaucoup le plus étudié (Erdtmann [27], Jenner et Kay [38], Roche et Nguyen-van Thoai [68]). Tous ces auteurs lui reconnaissent un effet acti-

vateur très puissant sur la phosphomonoestérase alcaline, en dépit de quelques controverses au sujet de son action sur les phosphatases à pH optimum voisin de la neutralité, ou acide, on peut conclure à un effet indifférent, ou même légèrement inhibiteur à pH 5,0 - 6,0 (Albers [1], Nguyen-van Thoai [57]).

Mn^{++} serait un activateur plus puissant encore de la phosphoestérase alcaline (Bamann [11], Massart et Vandendriesche [48]). J. Baudoin [17] a noté aussi une activation de la phosphatase à pH = 6 - 6,4 des hématies. De même Ni^{++}, Co^{++}, Fe^{++} activent la phosphomonoestérase du foie [11].

$PO_4^{\equiv}$ est un inhibiteur général des phosphatases (Jacobson), son action serait plus sensible sur les enzymes acides.

L'ion fluorure qui a peu d'action sur l'estérase alcaline est au contraire un fort inhibiteur des phosphatases acides (Belfanti, Contardi et Ercoli [20], Munemura). L'ion oxalate inhibiteur des phosphatases acides a une action contestée sur les alcalines. Pour Munemura [52], l'effet inhibiteur serait beaucoup plus puissant encore sur ces dernières. Pour Roche et ses collaborateurs [66] l'action serait peu sensible ou même indifférente.

La cystéine et les thiols qui exercent un effet fortement inhibiteur sur les phosphatases alcalines (Albers, Roche [66]) n'ont pratiquement pas d'action sur les phosphatases acides (Baudoin [17]).

Le phlorizoside, fort inhibiteur des phosphatases alcalines (Courtois et Rabaté [23]), est un inhibiteur faible (pH = 4) ou nul (pH = 5,5) des enzymes acides.

II. — ÉTUDE GÉNÉRALE DES PYROPHOSPHATASES.

A. — **Répartition dans la nature.**

Les pyrophosphatases sont très répandues aussi bien dans le règne animal que dans le règne végétal où elles coexistent souvent avec les phosphomonoestérases.

1. Pyrophosphatases animales. — En 1926, Neuberg et Wagner [53] ont montré que le diphénylpyrophosphate était presque complètement hydrolysé par la takadiastase et par les extraits de rein de cheval. Deux ans plus tard, Kay a constaté qu'un enzyme hydrolysant le pyrophosphate de sodium est très répandu dans les tissus animaux, et que sa répartition est parallèle à celle de la phosphomonoestérase. La pyrophosphatase existe dans les hématies, les globules blancs, le sérum, les os, l'intestin (Roche). On a signalé des pyrophosphatases dans les sécrétions et les excrétions : bile, suc pancréatique, suc intestinal, lait ; on en a trouvé aussi dans les crachats des tuberculeux ; les matières fécales en contiennent une grande quantité. La prostate et l'urine ne renferment par contre que la phosphomonoestérase A_2 (Kutscher, Courtois et Biget [24]). Les pyrophosphatases, comme d'ailleurs toutes les phosphatases, feraient totalement défaut dans certains tissus animaux : aorte, cartilage hyalin.

2. Pyrophosphatases végétales. — On retrouve également des pyrophosphatases dans toute l'échelle des végétaux. En 1926, Neuberg et Wagner [53] ont mis en évidence leur existence dans la takadiastase ; on les a retrouvées dans les levures basses et dans plusieurs espèces de basidiomycètes. Les feuilles vertes en contiennent aussi. Tapadhinas [76] a fait des recherches sur la spécificité des phosphatases de la feuille d'Euphorbe. La teneur en phosphatase des graines paraît être très importante. Fleury et Courtois [28] ont étudié l'activité pyrophosphatasique de préparations fermentaires d'amandes. Giri

[30] en a signalé dans la feuille de soja, Munemura et Takahashi [74] dans le son de riz.

L'activité phosphatasique des végétaux ne serait d'ailleurs pas constante : Ignatieff [34] en a étudié les variations dans la pousse de certains végétaux : pomme de terre, radis, blé et autres ; l'activité enzymatique semble être en relation avec l'état de croissance : la racine aurait un maximum d'activité au moment de la germination et les cotylédons au moment où ils commencent à devenir fonctionnels.

B. — Caractères des pyrophosphatases.

1. pH optimum d'action. — En 1928, Kay a mis en évidence dans les tissus animaux un enzyme hydrolysant le pyrophosphate de sodium, dont la répartition est analogue à celle de la phosphomonoestérase, mais dont le pH optimum d'action est compris entre 7,2 et 7,8. Kurata [42], en 1931, obtint à partir de l'extrait de rein un enzyme agissant à pH = 4, et, selon Takahashi [74], il existerait dans le rein deux pyrophosphatases à pH optimum d'action respectif de 4 et 9, et dans le son de riz une pyrophosphatase de pH optimum 5. Munemura [52] aurait préparé les 3 types.

Dans un extrait de poudre de foie traité par l'acétone Bamann et Gall [9] ont, en 1937, constaté l'existence de trois pyrophosphatases, de pH optimum respectif 3,9 à 4,2, 5,5 à 6 et 7,6 à 8,3.

En ce qui concerne les basidiomycètes, Nguyen-van Thoai [56] travaillant sur une préparation brute de lactaire délicieux, a mis en évidence un seul pH optimum d'action compris entre 3,8 et 4. C'est seulement après dialyse et absorption sur alumine qu'une deuxième pyrophosphatase à pH optimum d'action compris entre 5,8 et 6,4 est apparue. Roche, S. de Laromiguière et A. Laurens [65] ont caractérisé les pyrophosphatases alcalines de divers organes animaux : intestin, foie os, rein. Leur pH optimum est compris entre 7,4 et 8. Etablissant des

courbes d'activité d'hématies laquées sur pyrophosphate de Na en fonction du pH, Roche, Nguyen-van Thoaï et J. Baudoin [67] ont noté deux pH optima : le premier compris entre 3,8 et 4,2, le deuxième entre 4,8 et 5.8. Un troisième existe à pH = 7,6, comme dans la plupart des tissus animaux (Roche [63]).

On trouve dans les levures deux pyrophosphatases de pH optimum respectifs 3,8 et 6,5 dont la seconde a été isolée par Bauer [18].

En résumé, on peut conclure à l'existence probable de trois pyrophosphatases à pH optimum d'action respectivement de 3,8 à 4 pour la plus acide, 5,5 à 6,4 pour la deuxième et 7,2 à 8,0 pour la phosphatase alcaline. Ces pyrophosphatases coexistent dans les tissus animaux et végétaux avec les phosphomonoestérases et, en milieu acide, les enzymes des deux types ont sensiblement le même pH optimum d'action. C'est ce qui fait conclure parfois à une identité de leur nature et a par ailleurs rendu leur séparation très difficile.

En milieu alcalin il y a un net décalage de pH. En effet la pyrophosphatase a son pH optimum d'action à 7,2-8,3 alors que celui de la phosphomonoestérase est à 9 - 9,2. Toutefois, les systèmes phosphatasiques des organes, sauf celui du foie, sont assez mal définis et l'on ne sait pas si, dans certains milieux ne paraissant renfermer qu'une pyrophosphatase, d'autres enzymes ne sont pas masqués par des inhibiteurs naturels.

2. Activateurs et inhibiteurs. — L'action des activateurs et des inhibiteurs, vis-à-vis des pyrophosphatases, a été relativement peu étudiée et l'on trouve de nombreuses contradictions dans les résultats obtenus.

L'ion Mg^{++}, pour Munemura, serait assez peu actif sur les pyrophosphatases acides non purifiées ; celles du rein de porc et du son de riz sont indifférentes à son action. Bamann et Gall le confirment vis-à-vis de l'extrait de foie et Courtois vis-à-vis de la phosphatase acide des graines. J. Baudoin [17] et Roche et Baudoin [64], au

contraire, constatent une action activatrice sur l'enzyme acide de foie purifié par adsorption et élution, action qui augmente jusqu'à une concentration en Mg de 0,001 M/ litre, pour devenir inhibitrice à des doses supérieures. En ce qui concerne les hématies, J. Baudoin [17] note une action activatrice importante sur la pyrophosphatase acide et à peu près nulle sur la pyrophosphatase très acide.

L'action de Mg^{++} sur la pyrophosphatase alcaline est différente suivant les auteurs. Selon Munemura [52] une préparation de rein de porc ne subirait aucune activation à pH = 9 ; au contraire, pour Roche, de Laromiguière et Laurens [65], il y a une activation nette surtout sur la pyrophosphatase de rein et de foie à pH = 8, action maxima pour une concentration de qMg = 3, renforcée par purification. Selon Bamann et Gall [9], au même pH la fraction desmoenzyme d'un extrait acétonique de foie serait peu sensible, alors que la fraction lyoenzyme serait très fortement activée.

Dans une étude d'ensemble sur l'action de divers cations sur les phosphatases alcalines, Bamann, Heumüller, Werner et Carl [10] ont obtenu les résultats suivants sur les enzymes hépatiques (extraction ammoniacale rapide de poudre de foie traité par l'acétone, dialysé 2 jours.

Activation pour 100 pour

Substrat	Mg	Mn	Fe	Co	Ni	Cd
β-glycérophosphate	8.807	24.150	4.452	918	196	inhibition
Pyrophosphate....	3.990	0	685	1950	0	0
Mètaphosphate....	160	1500	810	1810	40	100
Triphosphate	306	0	112	56	0	0

Comme on le voit Mg^{++}, Co^{++} et Fe^{++} sont des activateurs de la pyrophosphatase, moins toutefois que de la phosphomonoestérase ; néanmoins, les valeurs obtenues par ces auteurs sont d'un ordre de grandeur bien supérieur à celui obtenu entre autre par Mg^{++}, par tous leurs devanciers, et l'on doit se demander si ces résultats ne traduisent pas une particularité de la pyrophosphatase alcaline du foie.

L'ion Zn^{++} serait un activateur de la pyrophosphatase (Horii [32]) ; l'enzyme brut serait insensible à l'action de l'ion Ca^{++} (Munemura).

L'ion fluorure exerce une action fortement inhibitrice sur la pyrophosphatase acide de rein de porc et de son de riz (Munemura), des graines d'amandes (Courtois), de même que sur l'enzyme acide du foie (Baudoin), comme sur la pyrophosphatase acide des graines (Courtois, Fleury et Courtois) ; mais il est sans action sur la pyrophosphatase alcaline (Munemura, Roche, de Laromiguière et Laurens). Pour Bauer [18] l'action inhibitrice de FNa sur la pyrophosphatase de pH optimum 6,4 de la levure peut être compensé par l'addition de Mg.

L'ion $PO^{\equiv}_4$ serait inhibiteur surtout des pyrophosphatases acides (Munemura). J. Baudoin a noté une forte inhibition de la pyrophosphatase acide du foie par le phosphate de potassium, alors que le glycérophosphate n'aurait aucune action, ce qui laisse supposer une combinaison des ions $PO^{\equiv}_4$ avec un groupement spécifique de l'enzyme.

L'ion $SO^{4=}$ a une action inhibitrice surtout sur les enzymes acides (Munemura).

L'ion molybdate exerçant une forte inhibition sur les pyrophosphatases acides est à peu près sans action sur les alcalines (Munemura).

Munemura a trouvé une inhibition importante par l'ion oxalique de la pyrophosphatase acide du rein, mais l'effet est nul sur celle de son de riz. L'ion oxalique sans action sur la pyrophosphatase acide de foie purifié par dialyse pourrait activer légèrement l'enzyme purifié par

adsorption et élution (Baudoin). En ce qui concerne la pyrophosphatase alcaline, l'inhibition importante notée par Munemura est en contradiction avec les travaux de Roche, de Laromiguière et Laurens pour qui les oxalates seraient sans action.

L'ion CN^- inhibe la pyrophosphatase alcaline d'intestin à dose relativement élevée ; il est activateur à faible concentration (S. de Laromiguière [44]).

La cystéine et les thiols, sans action sur la pyrophosphatase alcaline du foie seraient faiblement inhibiteurs de l'enzyme du rein, et davantage de l'intestin [65]). L'effet est moins sensible après purification. Le glutathion, à peu près sans action sur cet enzyme, paraît même être activateur à faible concentration [44]. La pyrophosphatase acide de foie, purifiée par adsorption et élution, est légèrement activée par la cystéine [17].

L'acide cholique, sans action sur la pyrophosphatase alcaline de l'intestin, exerce une faible inhibition sur l'enzyme du rein [65]. La pyrophosphatase acide du foie ne serait pas sensible à une concentration inférieure à 0,001 M/litre, concentration pour laquelle il y aurait un effet légèrement inhibiteur [17].

L'acide ascorbique est inhibiteur, surtout à doses faibles, vis-à-vis de la pyrophosphatase alcaline [44] ; au contraire, les deux pyrophosphatases des hématies sont très fortement activées par lui [17].

Le glycocolle est sans action sur la pyrophosphatase acide du foie [17]. Les corps oxydants et réducteurs : H_2O_2, acide monoiodacétique, ferricyanures alcalins, iode, perborates, ont une action minime et d'ailleurs irrégulière. L'action enzymatique serait insensible, du moins entre des limites très larges au potentiel d'oxydo-réduction (Laurens [45]).

En résumé, on peut constater que la pyrophosphatase alcaline est moins sensible à l'action des ions minéraux (Mg^{++}, Mn^{++}, Co^{++}) que la phosphomonoestérase alcaline. La cystéine, les thiols, l'acide cholique, ascorbique, le glycocolle ont une action faible ou même indifférente.

Les pyrophosphatases acides subissent des actions beaucoup plus nettes : on constate une inhibition sensible par les ions fluorures, $PO_4^{\equiv}$, $SO^{4=}$ et molybdate et une activation par l'acide ascorbique ; l'action de la cystéine et des thiols serait à peu près nulle ; quant à l'action de Mg^{++}, elle paraît différente, d'une part suivant la provenance de l'enzyme, d'autre part suivant son pH optimum d'action : en effet, chez les basidiomycètes (Nguyen-van Thoai), l'ion Mg^{++}, indifférent vis-à-vis de l'enzyme à pH = 5,5, produit une inhibition sur la pyrophosphatase à pH = 3,8. Il se conduit au contraire vis-à-vis des enzymes des hématies (Baudoin) comme un activateur, plus important de la pyrophosphatase à pH = 5,5. Enfin, son action serait pratiquement nulle sur les enzymes acides de rein de porc et de son de riz (Munemura).

En ce qui concerne l'action de l'ion oxalique sur les pyrophosphatases, on ne peut donner de conclusion définitive, par suite de la diversité des résultats obtenus.

D'une façon générale, les pyrophosphatases paraissent beaucoup moins influencées par les activateurs et les inhibiteurs que les phosphomonoestérases. Cependant, l'état actuel des travaux ne permet pas une conclusion définitive à ce sujet.

D'autre part, à l'exception de l'ion Mg^{++}, l'étude des divers cations sur l'action pyrophosphatasique demande à être complétée.

Enfin, d'après l'ensemble de ces résultats, on peut constater qu'il existe des comportements particuliers pour les enzymes, suivant leur origine, vis-à-vis des activateurs et des inhibiteurs. Nous avons vu, par exemple, que Mg^{++}, activateur général des pyrophosphatases alcalines, l'est à un très faible degré de celle de l'intestin. Le même enzyme, ainsi que celui du rein, sont spécifiquement inhibés par la cystéine ; la pyrophosphatase osseuse alcaline est seule inhibée par les oxalates ; l'acide cholique, inactif sur l'enzyme intestinal, gêne fortement l'action de la pyrophosphatase rénale. Nous avons noté de même l'action inégale de Mg^{++} sur les pyrophospha-

tases acides. Mais on ne peut donner, jusqu'à présent, l'interprétation définitive de cette spécificité, qui peut être due soit à la diversité des apoenzymes protéiques, soit à celle des métaux contenus dans le coferment.

3. Spécificité de substrat. — Y a-t-il un seul enzyme qui hydrolyse tous les pyrophosphates naturels et synthétiques, ou faut-il au contraire une pyrophosphatase spécifique pour chaque substrat ?

On a réussi à hydrolyser avec des préparations faites à partir de tissus animaux ou végétaux, les substrats les plus divers : pyrophosphates minéraux, diphénylpyrophosphates (Neuberg, Tapadinhas [76], Kurata [42]), di-*o*-crésylpyrophosphate, di-*m*-crésyl pyrophosphate et α-naphtylpyrophosphate (Neuberg et Jacobson [54]), *l*-difenchylpyrophosphate (Ochai [58]), adénosinetriphosphate (Satoh [72]), aneurinepyrophosphate (Westenbrink et ses collaborateurs).

Le problème a été spécialement étudié par Kurata, à propos du diphénylpyrophosphate.

L'hydrolyse de ce corps sépare-t-elle en premier lieu le phénol du reste phosphorique ou au contraire scinde-t-elle d'abord le substrat en deux monophénylphosphates dédoublés ensuite en phénol et PO_4H_3.

Or, Kurata constate que d'une part l'enzyme du sang de lapin hydrolyse le monophényl pyrophosphate et il est sans effet sur le pyrophosphate et le diphényl, et d'autre part, la takadiastase hydrolyse le monophényl et le pyrophosphate, mais elle est sans action sur le diphényl, ce qui fait supposer l'existence d'un troisième facteur.

Dans une autre série d'expérience, Kurata fait agir une préparation rénale sur du diphényl pyrophosphate : il n'y a aucune libération de P ni de phénol ; en ajoutant une préparation de foie l'hydrolyse se produit. Or, en inversant l'ordre des phénomènes, il n'obtient aucune action : ceci prouve que dans la première expérience on a scindé le diphényl en monophényl, lui-même hydrolysé par l'enzyme de foie.

D'autre part Takahashi, ajoutant une préparation ré-

nale tuée par la chaleur à de la takadiastase, inactive sur le diphénylpyrophosphate, produit une hydrolyse énergique de celui-ci ; il en conclut à l'existence d'un inhibiteur naturel dans la takadiastase.

Pour Neuberg et Fischer [55] l'hydrolyse de l'ester aromatique n'est pas due à l'action d'un activateur étranger, mais à l'action additive de deux enzymes : pyrophosphatase et monoestérase. C'est ce que démontre Nguyen-van Thoai : il fait une préparation enzymatique de basidiomycètes, presque débarrassée de phosphoestérase, qui n'a aucune action sur le diphénylpyrophosphate, sauf dans la zone de pH = 6, où peut agir faiblement le très petit reste de monoestérase. C'est ce qu'il met en évidence par l'action inhibitrice inégale de Mg^{++} sur la pyrophosphatase et la monoestérase ; il ne s'agit donc pas de pyrophosphatases spécifiques, mais bien de l'action conjuguée de deux enzymes différents.

L'adénylpyrophosphatase est-elle un enzyme différent de la pyrophosphastase ? Jacobsen [37] aurait isolé à partir du foie de mammifère un enzyme inactif sur les pyrophosphates et les esters orthophosphoriques et qui dédoublerait l'adénylpyrophosphate de sodium en adénosine diphosphate et acide orthophosphorique. Ceci a été confirmé par Barrenscheen et Lang [16] qui ont isolé l'enzyme de la phosphatase osseuse et musculaire et ont constaté une action essentiellement différente des activateurs et inhibiteurs des phosphatases. Son hydrolyse, en effet, fortement inhibée par les fluorures et les cyanures alcalins, beaucoup moins par l'ion Mg^{++} et le glutathion, serait activée par l'ion $SO^{4=}$ et par la cystéine. Liebnecht a étudié aussi l'hydrolyse de l'acide adénylpyrophosphorique. Pour lui, le phosphore facilement hydrolysable est libéré d'abord, ensuite le P lié au ribose. Ceci est en contradiction avec Barrenscheen et Lang pour qui le phosphore difficilement hydrolysable est libéré le premier.

Enfin, pour Satoh [72] il n'y aurait pas d'enzyme spécifique de l'adénylpyrophosphate, mais action combinée

de phosphomonoestérase et de pyrophosphatase, comme dans le cas précédent.

C'est en déterminant le mécanisme exact de l'action enzymatique que l'on pourra connaître d'une façon certaine la constitution de l'acide adénylpyrophosphorique.

Le même problème se pose d'ailleurs pour les acides nucléiques : on sait en effet que leur hydrolyse exige l'intervention de deux enzymes : la polynucléotidase spécifique qui isole les polynucléotides (entre autres les tétranucléotides) et la nucléotidase qui est une phosphomonoestérase ordinaire, libérant l'acide phosphorique. Mais les nucléotides sont-ils reliés entre eux par estérification de l'acide phosphorique ? C'est en caractérisant l'action de l'enzyme que l'on pourra résoudre le problème.

C. — Différenciation des pyrophosphatases et phosphomonoestérases.

Dès 1926, Neuberg et Wagner montrent l'existence d'un enzyme différent de la phosphomonoestérase, agissant spécifiquement sur les pyrophosphates.

Depuis, malgré leur répartition parallèle dans la plupart des organes, sauf la prostate, et leur pH optima d'action analogue (sauf pour les phosphatases alcalines), tous les travaux tendent à prouver la différenciation des deux enzymes : ils ont en effet une acido-résistance différente, une liaison plus ou moins étroite aux cellules, une inégale résistance à la chaleur. Parmi les arguments sur lesquels on se fonde pour démontrer leur spécificité nous étudierons spécialement la possibilité de séparation des deux enzymes et leur action inégale vis-à-vis des activateurs et des inhibiteurs.

1. Séparation des deux enzymes. — Cette séparation s'est montrée une opération très délicate par suite du comportement souvent analogue des deux enzymes. Les modes de séparation mis en jeu sont de plusieurs sortes :

adsorption ;
destruction thermique ;
destruction par H^+ et OH^-.

Elle a été réalisée de manière indiscutable pour la première fois par Bauer [18].

a) *Adsorption.* — Kurata [42] isole la pyrophosphatase de rein par adsorption de l'autolysat légèrement alcalin sur $Mg(OH)_2$; le liquide résiduel, en milieu acide, hydrolyse seulement les pyrophosphates.

Takahashi [74] sépare dans un autolysat de rein la pyrophosphatase alcaline des autres phosphatases par adsorption de la première sur du kaolin en milieu légèrement acidifié par PO_4NaH_2, puis élution en présence de phosphate dipotassique. Cependant dans de nombreuses expériences, faites dans les mêmes conditions, A. Laurens et S. de Laromiguière n'ont jamais retrouvé ces résultats.

Selon Bauer [18] l'adsorption d'une préparation de levure basse sur alumine C γ en milieu légèrement alcalin, fournirait une préparation active seulement sur l'α-glycérophosphate.

L'adsorption sur cholestérol a permis à S. de Laromiguière et A. Laurens d'éliminer en partie la pyrophosphatase d'une préparation de phosphomonoestérase alcaline de muqueuse intestinale. Grâce à la précipitation acétonique fractionnée suivie de l'adsorption au kaolin, la pyrophosphatase de pH optimum 5,8 est séparée de la phosphomonoestérase de même pH optimum (Roche et Baudoin [64]).

Enfin, J. Baudoin a pu isoler ainsi la pyrophosphatase acide du sang : la phosphomonoestérase acide est à peu près complètement adsorbée par du kaolin, après agitation de l'hémolysat amené à pH = 5 ; l'éluat renferme une grande activité phosphatasique.

b) *Destruction thermique.* — Bauer [18] a pu isoler la pyrophosphatase de levure basse, qui, placée dans les mêmes conditions, serait plus résistante à la chaleur que

la monoestérase. Mais A. Laurens et S. de Laromiguière ont essayé sans résultat par chauffage à diverses températures d'isoler la pyrophosphatase alcaline d'intestin. La stabilité de cet enzyme et de la phosphomonoestérase alcaline paraît être tout à fait analogue.

c) *Séparation par action des ions H^+ et OH^-* — Bamann et Gall isolent la pyrophosphatase très acide en maintenant l'extrait ammoniacal de foie vers pH = 9 pendant 24 heures à 37° : toutes les phosphoestérases acides sont détruites. En ramenant vers l'acidité ils détruisent la pyrophosphatase alcaline et il reste une préparation active en pyrophosphatase de pH optimum 5,5 et pauvre en pyrophosphatase de pH optimum 4.

Si l'adsorption, la destruction thermique, la destruction par H^+ et OH^- permettent de démontrer dans une certaine mesure l'individualité de l'enzyme, il ne faut cependant pas attribuer à ces tests une valeur trop absolue. En effet, on ignore le mécanisme de la destruction de l'enzyme. L'inactivation se produit-elle par perte du coferment, destruction de l'apoferment, départ d'un activateur ou simple destruction d'un groupement de l'enzyme spécifiquement actif de l'un des deux types de substrat ?

2. Différence d'activation et d'inhibition. — Un second caractère sur lequel on se base pour différencier les deux enzymes, est leur réaction différente vis-à-vis des activateurs et des inhibiteurs.

Alors que l'action de *l'ion Mg^{++}* sur la pyrophosphatase est, comme on l'a vu, très discutée suivant les auteurs, tous s'accordent à trouver un effet très fortement activateur sur la phosphomonoestérase. Les enzymes acides réagissent inégalement aussi à son action : la monoestérase de son de riz est activée par Mg^{++} alors que la pyrophosphatase ne l'est pas (Munemura). Les enzymes acides du sang subissent tous les deux une action activatrice du Mg^{++}, plus forte cependant pour la phosphoestérase. En ce qui concerne les enzymes très acides, cette action

est tout à fait différente : alors que la pyrophosphatase est assez peu sensible, J. Baudoin note une inhibition importante de la phosphomonoestérase.

On a étudié l'action d'autres ions métalliques qui semble être différente sur les deux enzymes. Bamann et Heumüller [11] ont observé dans le foie de porc une activation par Fe^{++}, Ni^{++} et Co^{++} plus importante pour la phosphomonoestérase que pour la pyrophosphatase.

Mn^{++}, activateur très énergique de la première, serait indifférent ou n'aurait que peu d'effet sur la deuxième (Bamann).

L'action de Ca^{++} est discutée. Pour Munemura, cet ion serait indifférent sur les deux enzymes. Selon Kuwabara [41], Ca^{++} activerait la phosphatase A_1 des cals de fractures et enfin, pour Keeser [40], il serait antagoniste de l'ion Mg^{++}, en raison de leur action inverse sur la stabilité des colloïdes protéiques.

L'ion $PO_4^{\equiv}$ assez peu inhibiteur des pyrophosphatases acides, exercerait une action beaucoup plus forte sur les phosphomonoestérases (Munemura).

La *cystéine* et les *thiols* sont très fortement inhibiteurs de la phosphomonoestérase alcaline, l'action est beaucoup moindre sur la pyrophosphatase (sauf sur celle de muqueuse intestinale) (Roche, Laurens, de Laromiguière).

L'acide cholique est nettement inhibiteur de la monoestérase alcaline du foie, du rein et des os, beaucoup moins de celle de l'intestin (Bodansky). Les pyrophosphatases, sauf celle de rein qui est faiblement inhibée, sont insensibles à son action (Roche, de Laromiguière et Laurens). Les enzymes acides seraient faiblement inhibés par l'acide cholique.

L'acide ascorbique, peu activateur de la phosphoestérase alcaline, inhibe faiblement la pyrophosphatase intestinale. Les phosphatases des hématies réagissent aussi très différemment vis-à-vis de ce corps : l'activation est beaucoup plus énergique pour la pyrophosphatase à pH optimum de 5,4 que pour la monoestérase. Celle-ci, de

pH optimum très acide, est inhibée alors que la pyrophosphatase subit au contraire une activation (Baudoin).

Le *glycocolle* sans action sur la pyrophosphatase acide de foie serait faiblement activateur de la phosphomonoestérase alcaline purifiée (Bodansky).

En résumé, il y a des corps dont l'action est maintenant bien établie, d'autres pour lesquels elle est plus douteuse.

Mg^{++}, net activateur de la phosphomonoestérase alcaline, l'est à un degré moindre de la pyrophosphatase. Les enzymes acides sont beaucoup moins sensibles à cette action inhibitrice pour la phosphoestérase très acide. Mn^{++}, activateur énergique de la phosphomonoestérase alcaline, est à peu près sans action sur la pyrophosphatase. Celles-ci sont beaucoup moins sensibles à l'action inhibitrice de la cystéine, de l'acide cholique, que les phosphoestérases. Quant à l'action des métaux, comme Fe^{++}, Ni^{++}, Ca^{++}, du glycocolle, les résultats sont insuffisants pour conduire à une conclusion certaine.

On voit donc l'action très inégale des inhibiteurs et des activateurs sur les deux phosphatases : il y a presque toujours une différence de degré d'activité sinon une différence d'action. Cependant ces résultats ne permettent pas une différenciation suffisante entre phosphoestérase et pyrophosphatase. Les caractères de ces deux enzymes doivent être mieux définis ; en effet, la plupart des travaux antérieurs portent sur des préparations enzymatiques brutes ou insuffisamment purifiées. Les données actuellement acquises doivent être complétées par une étude systématique de l'action de chaque corps actif, en particulier en ce qui concerne celle des ions métalliques.

3. Sur quoi reposent ces différences ? — L'hydrolyse des pyrophosphates et des glycérophosphates est, comme nous l'avons vu, très différemment influencée par les activateurs et les inhibiteurs ; l'action paraît être particulièrement différente en ce qui concerne les métaux, et ceci est intéressant au point de vue de la constitution

des phosphatases. Il y a en effet à ce sujet plusieurs théories qui mettent en évidence l'action importante des groupements métalliques ; en se basant sur les résultats obtenus sur les phosphomonoestérases l'on doit se demander si leur extension aux pyrophosphatases n'est pas possible.

A la suite des travaux de Willstätter et Von Euler, on considère la molécule enzymatique comme formée de deux constituants distincts : l'apoenzyme, partie protéique conférant à l'enzyme sa spécificité et le coenzyme, catalyseur de la réaction par son groupement actif ; pour divers enzymes ce groupement actif est un métal existant sous forme réduite et oxydée.

Albers [1, 4] applique cette théorie aux phosphatases : l'holophosphatase ou molécule active serait constituée par la réunion de l'apophosphatase de nature protéique qui conférerait à l'enzyme sa spécificité de substrat et de pH, et la cophosphatase à qui serait due la spécificité d'action. Les phosphatases auraient des apoenzymes spécifiques mais il se pourrait que leurs coenzymes soient analogues. En effet, Albers, faisant une courbe d'inactivation en fonction du pH, a montré que la phosphatase alcaline du rein s'inactive à pH acide, alors que celle de levure haute s'inactive pour des pH alcalins ou très acides ; dans la zone d'inactivation, l'holophosphatase se dédouble en apophosphatase et cophosphatase. Or, la phosphatase de levure haute, portée à pH alcalin, perd alors son coferment, qui mis en présence d'apophosphatase rénale ⟶ holophosphatase rénale. De même l'holophosphatase rénale, maintenue à pH 5,6 cède son coferment à la levure haute, pour donner l'holophosphatase de levure stable à ce pH. Il se pourrait donc que le coferment des phosphatases soit interchangeable.

En ce qui concerne le rôle des métaux, Albers [4] a montré qu'ils ne constituaient pas le coferment lui-même. On sait que par dialyse, on peut séparer le coferment de la phosphatase rénale ; or, on trouve aussi dans le liquide dialysé du Mg. Le dialysat, sans effet sur le glycérophosphate, est presque entièrement réactivé par le coferment,

et cette action est encore renforcée par Mg. Or, le dialysat est aussi activé, mais plus faiblement par l'addition seule de Mg, ce qui prouve l'action distincte du coferment et du métal sur l'apoferment et ce qui expliquerait l'action différente des métaux et des activateurs en général sur les pyrophosphatases et les phosphomonoestérases qui, pour Fleury et Courtois [28], auraient des apoenzymes différents et un même coferment.

Cloettens [21], étudiant les phosphatases alcalines, donne une interprétation différente de la molécule enzymatique. Il la considère comme formée d'une partie protéique E, reliée à trois groupements G_1, G_2, G_3 dont les deux premiers peuvent se combiner à des métaux M_1 et M_2 et le troisième, normalement libre, pourrait être bloqué par un groupement métallique et dans ce cas provoquerait une inhibition de l'enzyme. Par dialyse contre Co_3NaH, il y aurait départ de M_1 (qui peut être Ca^{++}, Mg^{++}, Co^{++}, Ni^{++}, Mn^{++}) et perte de 98 p. 100 d'activité ; et par dialyse contre CNK à pH = 9, M_2 (Zn^{++}, Co^{++}, Hg^{++}) se séparerait ; d'autre part si M_1 est absent, M_2 se fixe sur G_1, ce qui entraîne une inhibition, disparaissant d'ailleurs lorsque M_2 atteint une certaine concentration, mais M_2 ne se fixerait pas sur un deuxième groupement ou sur une autre molécule enzymatique : en effet, après réactivation par Zn^{++}, Co^{++} ou Hg^{++} on peut ajouter un deuxième métal sans augmenter l'action activatrice.

Le problème de l'activation ou l'inhibition par les métaux apparaît à l'auteur comme assez complexe et lié, dans certains cas tout au moins, à l'existence de *coactivateurs* et de *coinhibiteurs*. C'est ainsi que, comme l'ont montré Hove, Elvehjem et Hart [33] Zn est inhibiteur de la phosphomonoestérase alcaline de l'intestin dialysé et inhibiteur de cet enzyme dans les extraits de muqueuse bruts, fait confirmé par de Laromiguière et Laurens. Les mêmes auteurs ont montré que, dans le premier cas, une action coactivatrice, devant être attribuée à des produits de protéolyse, le couple alanine-zinc était activateur de l'enzyme dialysé, les acides α-aminé n'étant

par eux-mêmes que très faiblement actifs. Une observation de même ordre a été faite sur la pyrophosphatase alcaline du foie par Roche, Nguyen-van Thoai et Milhau [69] selon lesquels la cystéine à faible concentration n'inhibant pas cet enzyme, et l'ion Fe^{++} ne l'activant que très modérément, le couple cystéine-fer est très fortement activateur.

On peut expliquer, par ces théories, l'action inhibitrice des fluorures et des cyanures ; on sait que ces corps donnent des complexes métalliques et privent ainsi la phosphatase de son métal actif : en effet, la phosphatase du rein, activée par Mg^{++}, Co^{++}, Zn^{++} est inhibée par CNK ; la phosphatase alcaline du foie, la phosphomonoestérase A_4 du sang et la phosphatase acide des levures, activées par Mg^{++}, sont fortement inhibées par FNa.

Tous ces travaux ont porté jusqu'à présent sur les phosphomonoestérases. Peut-on étendre ces données aux pyrophosphatases ? Une étude parallèle s'impose en ce qui concerne ces derniers enzymes.

C'est pourquoi, nous basant d'une part sur la théorie d'Albers, d'après laquelle une dialyse des phosphatases à un pH donné permet de scinder la molécule enzymatique en apophosphatase et cophosphatase, nous essayerons de dissocier l'enzyme pour le réactiver ensuite à l'aide d'ions métalliques ; nous appuyant d'autre part sur l'interprétation enzymatique de Cloettens faisant intervenir le rôle activateur ou inhibiteur des métaux constituant l'enzyme, nous chercherons à l'aide d'une dialyse contre des formateurs de complexe, à éliminer ces métaux pour définir leur rôle exact. Enfin, ajoutant de nouveaux groupements métalliques aux enzymes ainsi traités, nous essayerons de définir leur pouvoir activateur ou inhibiteur.

III. — OBJET DU TRAVAIL.

Dans l'état actuel de nos connaissances, les pyrophosphatases sont encore décrites de manière insuffisante, c'est pourquoi nous essayerons de préciser :

Les caractères des pyrophosphatases acides et alcaline, et la différenciation entre les pyrophosphatases et phosphomonoestérases.

1. La notion d'isodynamie des phosphomonoestérases, maintenant bien définie, a été basée sur leurs différences de pH optima d'action, leur sensibilité inégale aux activateurs et inhibiteurs et leur spécificité vis-à-vis de l'α et du β-glycérophosphate. Or, les connaissances actuelles permettent d'envisager l'existence de pyrophosphatases isodynames sans que cette notion soit encore aussi précise que celle établie sur les phosphomonestérases. C'est pourquoi, en nous guidant sur l'étude des phosphomonoestérases, nous nous proposons :

a) de faire une étude systématique qui nous permette de mettre en évidence, par leur pH optima d'action (3,6 à 4,0 ; 5,2 à 5,6 et 7,4 à 8,2), l'existence simultanée de trois pyrophosphatases isodynames, que les travaux antérieurs laissent prévoir.

b) d'étudier l'action de certains ions métaliques : Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++}, Zn^{++}, aux différents pH optima d'action, après avoir purifié les enzymes dans des conditions de pH telles que leur intégrité soit respectée.

2. Nous avons signalé le manque de précision dans la différenciation des phosphomonoestérases et des pyrophosphatases. Les travaux actuels ont porté le plus souvent sur des enzymes bruts ou insuffisamment purifiés ; c'est pourquoi on a observé seulement de faibles différences qui ne permettent pas de conclure à une spécificité absolue des deux enzymes. D'autre part, si l'on excepte

Mg^{++}, l'action comparée des cations a été très peu étudiée sur les deux enzymes.

Aussi avons-nous cherché à mettre en évidence les différences d'activation et d'inhibition de certains ions métalliques : Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++} et Zn^{++}, après purification des deux phosphatases par une dialyse prolongée. Enfin, nous avons tenté, par l'action des formateurs de complexe, de dégager l'importance du rôle des cations dans l'action du coenzyme sur le substrat.

DEUXIÈME PARTIE.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Nous venons de résumer l'ensemble des travaux antérieurs sur les pyrophosphatases animales ou végétales et nous avons constaté que les résultats actuels ne permettent pas encore d'établir d'une façon certaine l'existence de trois pyrophosphatases isodynames. Nous nous proposons de compléter ces données, d'une part en mettant en évidence dans divers organes animaux : foie, rein, intestin, la présence de trois pH optima d'action, d'autre part d'étudier l'action d'activateurs ou d'inhibiteurs sur les trois pyrophosphatases isodynames.

Enfin, nous essayerons par une étude comparée de divers ions métalliques sur les pyrophosphatases et les phosphomonoestérases alcalines, d'apporter une contribution à l'étude du problème de la constitution de ces enzymes. C'est pourquoi notre travail comportera deux chapitres :

I. — Caractères différentiels des pyrophosphatases isodynames.

II. — Action des cations : Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++}, Zn^{++}, sur les pyrophosphatases et les phosphomonoestérases alcalines.

CHAPITRE I.

CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES PYROPHOSPHATASES ISODYNAMES.

La notion d'isodynamie des phosphomonestérases, basée sur les différences de pH optimum d'action, de spécificité vis-à-vis de l'α et du β-glycérophosphate, de sensibilité à des réactifs d'activation et d'inhibition, n'est actuellement plus discutée en ce qui concerne ces enzymes. Une confirmation de ce fait est d'ailleurs donnée par la possibilité de les isoler des pyrophosphatases par adsorption ou par destruction à l'aide des ions H^+ et OH^- C'est ainsi que TAKAHASHI et BAUER ont isolé des enzymes n'agissant plus que dans une zone de pH très limitée, ce qui prouve bien que l'enzyme acide est essentiellement différent de l'enzyme alcalin.

Mais à ce point de vue, les caractères des pyrophosphatases restent actuellement imprécis. La seule donnée sur laquelle on puisse baser l'existence de pyrophosphatases isodynames est la diversité de leur pH optimum d'action. Nous avons vu en effet que, d'après les travaux antérieurs, il existerait trois enzymes différents, à pH optimum d'action respectifs de 3,6 - 4 pour le premier, 5 - 6 pour le deuxième et 7,4 - 8,4 pour la pyrophosphatase alcaline.

Nous nous proposons, pour coordonner ces résultats, de mettre en évidence la coexistence de ces trois pyrophosphatases dans les organes animaux : foie, rein, intestin. Si l'on ne peut pas toujours les observer sur l'extrait d'organe brut, peut-être apparaîtront-elles soit en faisant varier les conditions d'extraction (autolyse plus ou moins poussée, extraction acétique ou ammoniacale) soit en purifiant le produit par dialyse, soit enfin en

faisant intervenir l'action d'activateur spécifique (ions métalliques) ou de couples de coactivateurs et d'activateurs (couple cystéine-fer).

Quant à la spécificité de substrat, nous avons vu, en étudiant le problème de l'adénylpyrophosphatase et de la diphénylpyrophosphatase, que l'on ne pouvait se baser sur ce test puisque l'on ignore si ces enzymes sont véritablement spécifiques.

C'est pourquoi notre étude portera sur des caractères d'activateurs ou d'inhibiteurs par des cations : Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++}, Zn^{++}, sur les trois pyrophosphatases. Si nous pouvons montrer qu'aux différents pH optima d'action correspondent des sensibilités propres à chaque enzyme, nous pourrons conclure à l'existence de trois pyrophosphatases isodynames.

A. — Techniques.

1. Préparation des enzymes. — Nous nous sommes préoccupés de travailler sur des produits homogènes, d'activité constante. C'est pourquoi nous avons préparé des lots de poudres d'organes desséchés et à partir desquelles la solution enzymatique a été obtenue extemporanément.

a. *Conservation des organes.* — Nous avons préparé des organes de chien (intestin, foie) et de bœuf (rein) traités aussitôt après le prélèvement ou conservés quelques heures à la glacière (1).

L'intestin a été lavé par un courant d'eau puis ouvert sur toute la longueur ; la muqueuse a été raclée au scalpel et desséchée à trois reprises par son volume d'acétone froide, laissé très peu de temps en contact pour éviter la dénaturation de l'enzyme.

Le foie et le rein ont été lavés à l'eau froide, puis pulpés au broyeur Latapie, et ensuite déshydratés trois fois à l'acétone comme dans le cas de l'intestin.

(1) Nous remercions M. le Professeur F. Mercier de nous avoir procuré les organes de chien utilisés pour ces expériences.

Les poudres ainsi obtenues sont desséchées quelques jours sous vide sulfurique, pulvérisées au mortier pour homogénéiser les produits venant d'animaux différents, et conservés dans des flacons bien secs et paraffinés.

Enfin, nous avons utilisé pour certaines expériences des préparations de reins de bœuf purifiées suivant la technique d'Albers (1).

b. *Préparations des solutions enzymatiques.* — Le plus souvent l'extraction a été faite par l'eau distillée dans la proportion de 1 g. d'organe pour 30 g. d'eau. Nous avons utilisé deux types d'extraction :

1) Extraction de courte durée : la poudre d'organe est mise en contact avec l'eau distillée pendant 1 heure avec agitation fréquente. Le lyoenzyme seul passe en solution.

2) Autolyse : l'extrait d'organe est mis à macérer dans l'eau distillée pendant 48 heures en présence de chloroforme soit à la glacière soit à 18°. Ces expériences portent donc sur le desmoenzyme, et de plus les ions métalliques et les produits de protéolyse passent en solution et interviendront au cours de l'hydrolyse.

Les solutions enzymatiques préparées à partir du produit de purification d'Albers sont faites par extraction à l'eau distillée pendant une demi-heure dans la proportion de 1 partie d'extrait pour 100.

Enfin, nous avons utilisé des extractions ammoniacales (Am OH N/20) ou acétique (acide acétique N/40).

c. *Dialyse.* — Nous avons étudié les caractères d'activation des pyrophosphatases isodynames sur les enzymes purifiés par une dialyse de cinq jours, et pour éviter la dissociation des enzymes ces dialyses ont été faites contre des solutions à un pH voisin de celui de leur opti-

(1) Un kilog de rein de bœuf a été traité par 100 cm³ de mélange à parties égales de toluène et d'éther acétique, additionné de 1 litre d'acétone à 25 p. 100, pendant 4 à 5 jours à 18° en agitant de temps en temps. Nous avons filtré puis ajouté de l'acétone jusqu'à une concentration de 65 p. 100 en acétone. Nous avons laissé reposer quelques heures, puis décanté et lavé le précipité deux fois à l'alcool et une fois à l'éther, et ensuite desséché sous vide sulfurique pendant quelques jours.

mum d'action. C'est ainsi que pour la pyrophosphatase acide nous avons utilisé une solution d'acide acétique N/40, pour la pyrophosphatase à pH 5,6 nous avons dialysé contre de l'eau pure et pour la pyrophosphatase alcaline contre une solution acéto-acétique à pH = 7,4. L'enzyme ainsi stabilisé perd peu d'activité, et la dialyse prolongée permet une purification qui augmente le pouvoir réactionnel de l'enzyme.

2. Hydrolyse. — Elle est faite dans des tubes jaugés de 10 cm^3 en présence de 2 cm^3 de pyrophosphate de soude N/10 comme substrat avec 1 ou 2 cm^3 de solution enzymatique suivant l'activité de la préparation. L'échelle de pH est obtenue avec des solutions tampon (acéto-acétique ou véronal sodique). L'hydrolyse de 1 heure ou deux est faite au bain-marie à 37° ; on arrête la réaction avec 0,5 cm^3 de SO_4H_2 à 30 p. 100 ou avec 2 cm^3 d'acide trichloracétique à 20 p. 100 pour les produits moins actifs sur lesquels le dosage se fait avec une plus grande quantité de liquide.

3. Dosage. — Nous avons employé pour le dosage du P libéré, la méthode de Briggs-Robison réalisée à l'aide d'un colorimètre à cellule photoélectrique, sur une quantité de filtrat correspondant à 50 à 150 γ de P. Le dosage doit être fait exactement 20 minutes après la coloration, car en milieu fortement sulfurique le pyrophosphate, peu stable, s'hydrolyse rapidement et il se produit une coloration anormalement élevée. Les résultats sont exprimés en γ de P total libéré au cours de l'hydrolyse.

B. — Exposé des résultats.

Nous avons, dans une première partie, établi des courbes d'activité en fonction du pH pour mettre en évidence les trois optima d'action et, dans une deuxième partie, nous avons étudié l'action des cations : Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++}, Zn^{++} successivement aux trois pH optima d'action

pour montrer leur différence d'activation sur les trois pyrophosphatases isodynames.

1. Mise en évidence de trois pyrophosphatases dans les organes animaux. — Nous avons établi pour chaque organe une courbe d'activité en fonction du pH en faisant varier les conditions d'extraction : extrait de courte durée qui donne l'enzyme brut ou lyoenzyme (préparation A), extraction par autolyse de 48 heures qui fournit le desmoenzyme (préparation B).

a. *Activité pyrophosphatasique de préparations de reins de Bœuf en fonction du pH.* — On trouvera dans le tableau I les résultats obtenus avec deux préparations de reins de bœuf faites dans les conditions décrites ci-dessus (préparations I et II) auxquelles nous avons ajouté les résultats obtenus avec une préparation (III) purifiée suivant la technique d'Albers.

TABLEAU I. — *Activité pyrophosphatasique en fonction du pH, d'extraits de divers organes animaux.*

Préparation I : extraction 1 h. (1 partie de poudre acétonique + 30 p. eau distillée).
Préparation II : extraction de 48 heures.
Préparation III : extraction et purification suivant Albers.

pH	Rein de Bœuf			Foie de Chien		Intestin de Chien	
	I	II	III	I	II	I	II
3,6	*924*	316	168	435	447	*997*	798
4	861	*345*	*208*	*467*	*514*	997	*798*
4,6	840	264	189	351	362	787	819
5	793	*287*	189	346	351	787	798
5,6	*940*	207	157	267	288	735	724
6	882	224	*168*	267	273	714	*756*
6,4	861	230	157	241	257	703	724
7	840	264	315	220	320	871	882
7,4	814	368	304	*440*	525	1092	1050
8	861	*391*	436	378	*551*	*1239*	*1207*
8,4	*882*	391	*478*	378	509	1207	1207
9	861	—	304	315	519	1020	995

On note d'après ces résultats l'existence de trois optima d'action, respectivement aux pH = 3,6 - 4, 5 - 5,6 et 8 - 8,4. On peut remarquer que la forme desmoenzyme pas plus que la purification n'entraînent un déplacement de pH. Par ailleurs, le fait que la préparation I est de beaucoup la plus active doit sans doute être rattaché à l'extraction d'inhibiteurs naturels des desmoenzymes dans les autres.

b. *Activité pyrophosphatasique de préparations d'intestin de chien en fonction du pH.* — Comme dans le cas du rein nous avons employé une préparation résultant d'une extraction de courte durée (préparation I) et un produit d'autolyse de 48 heures (préparation II).

Les résultats du tableau I traduisent l'existence de deux pyrophosphatases acides et alcalines pour les deux préparations et on peut remarquer, pour l'enzyme brut, la disparition du pH optimum d'action de 5,6 qui apparaît sur le produit d'autolyse.

Nous citons à titre de référence les résultats obtenus par S. de Laromiguière [44] à partir d'un extrait aqueux d'intestin de chien ; on pourra ainsi noter l'influence du mode d'extraction de l'enzyme.

pH	3,4	4,0	4,8	5,4	5,88	6,52	6,96
p. 100 de substrat hydrolisé..	11,8	11,7	6,5	7,2	7,35	9,35	9,9
pH	7,24	7,35	7,7	8,02	8,87	9,8	
p. 100 de substrat hydrolisé..	15,5	18,1	21,8	26,50	16,9	14,3	

c. *Activité pyrophosphatasique de préparations de foie de chien en fonction du pH.* — Les résultats exprimés dans le tableau I rendent compte de l'existence de deux pyrophosphatases acide et alcaline. On voit que, aussi bien dans le cas du lyoenzyme (préparation I) que du desmoenzyme (préparation II), le pH optimum d'action intermédiaire est masqué.

Mais ce pH optimum existe, il a en effet été mis en évidence par J. Baudoin sur un extrait aqueux de foie de chien :

pH	4,2	5,2	5,5	6,4	7,5	7,8	8,6	9,2	9,4
γ de P libéré..	135	139	135	114	74	36	48	51	45

D'autre part on peut remarquer un léger déplacement du pH optimum d'action en milieu alcalin : alors que l'enzyme du rein et de l'intestin agit surtout à pH = 8,4, celui du foie est compris entre 7,4 et 8.

d. *Activité pyrophosphatasique de préparations de foie de chien en fonction du pH en présence du couple cystéine-fer.* — Nous avons utilisé pour mettre en évidence la présence des trois pH optima d'action des préparations hépatiques, l'action activatrice du couple cystéine-fer, déjà manifestée sur l'enzyme alcalin. L'extraction enzymatique a été faite par l'acide acétique N/30. Nous avons fait l'expérience d'une part en présence de cystéine seule (0,0016 Mol/litre) d'autre part en présence de cystéine à la même concentration et de Fe (0,001 Mol/litre). Les résultats du tableau II et de la figure I traduisent l'existence de 3 pyrophosphatases aux pH respectivement de 3,6, 5 (pour la deuxième hydrolyse seulement) et 7,4.

TABLEAU II. — *Activité pyrophosphatasique de préparation hépatique en fonction du pH, en présence de cystéine et du couple Fe_I + cystéine.*

Cystéine : 0,0016 M/litre ; Fe à l'état de sel de Morh : 0,001 M/litre. — Durée de l'hydrolyse : 1 heure avec 1 cm³ de solution enzymatique préparé par extraction à l'acide acétique N/30 pendant 1 heure.

pH	Cystéine γ de P total libéré	Cystéine + Fe	
		γ de P total libéré	p 100 activation
3,4	1260	1312	+ 4
3,6	*1312*	*1344*	+ 2
4	1260	1312	+ 4
4,6	1186	1239	+ 4
5	1165	*1302*	+ 11
5,6	1081	1239	+ 14
6	987	1092	+ 10
6,4	997	1354	+ 35
7	1029	1386	+ 34
7,4	*1029*	*1480*	+ 43

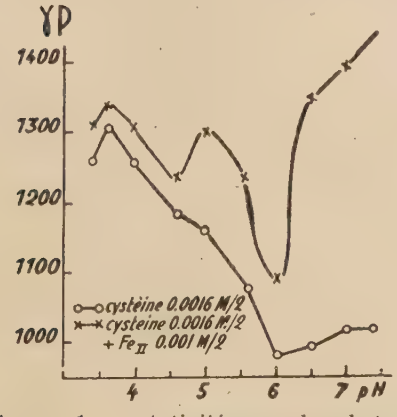

FIGURE 1. — *Activité pyrophosphatasique d'une préparation hépatique* (extraction d'une heure à l'eau) *en présence de cystéine* (0,0016 *M*) *et en la présence ou en l'absence de* SO_4Fe (0,001 *M*).
Abscisses : pH.
Ordonnées : γ P libéré.

On voit d'autre part l'action fortement activatrice du couple cystéine-fer dans la zone des pH alcalins, la cystéine seule n'activant pas la préparation on peut la considérer comme un coactivateur de Fe^{++}, faiblement activateur par lui-même.

Voici en effet les résultats obtenus sur une préparation d'extrait acétonique de

foie, autolysé pendant 48 heures. L'hydrolyse a été faite à pH = 7,4.

Corps ajoutés	γ de P libérés	p. 100 d'activation
Néant (Témoin).....	185	
Cystéine 0,009 M/litre.....	190	0
SO_4Fe 0,006 M/litre.....	285	54
Cystéine + Fe^{++}.....	400	116

e. *Activité pyrophosphatasique de préparations de foie de chien dialysé en présence de Mg^{++} et du couple cystéine-Fer.* — Nous avons fait l'expérience sur des préparations purifiées par une dialyse de 48 heures contre une solution tampon à pH = 7,4 pour éviter la dissociation de l'enzyme. L'extraction est constituée par une autolyse, dans l'eau chloroformée, de 48 heures à 18°.

TABLEAU III. — *Activité pyrophosphatasique de foie de chien à divers pH après dialyse de 48 heures contre une solution tampon à pH = 7,4.*

Préparation : extrait acétonique + eau distillée (1 g. pour 30) pendant 24 heures à 18°.

pH	Témoin γ de P total libéré	Mg. γ de P total libéré	Fe + cystéine	
			γ de P total libéré	p. 100 activation (+) ou inhibition (—)
3,6	187	172	153	
4,0	213	199	199	
4,6	177	187	172	
5	218	172	204	— 6
5,6	139	144	232	+ 67
6	129	139	247	+ 90
6,4	120	136	283	+136
7	148	172	—	—
7,4	172	232	432	+209
8	204	213	218	+ 6
8,4	172	213	187	

Le tableau III rend compte des résultats obtenus: on note l'existence des trois optima d'action sur la préparation pure. L'ion Mg^{++}, à la concentration de 0,001 Mol/litre, est pratiquement sans action sur l'hydrolyse sauf dans la zone de pH alcalin où il se montre légèrement activateur. Quant au couple cystéine-fer, comme dans le cas précédent, jusque vers pH = 5 l'activation est à peu près nulle ; mais elle est beaucoup plus importante que celle notée au tableau précédent pour les pH alcalins et elle atteint son maximum au pH optimum d'action de la pyrophosphatase c'est-à-dire à pH = 7,4.

Conclusions. — *a.* D'après l'ensemble de ces résultats on peut établir d'une façon certaine l'existence de trois pyrophosphatases isodynames à pH optimum d'action respectifs de 3,6 à 4,0, 5,0 à 6,0 et 7,4 à 8,4. Ces enzymes coexistent dans tous les organes animaux étudiés ; leur répartition est générale et parallèle à celle des phosphomonoestérases, avec lesquelles elles présentent des analogies de pH optimum d'action, sauf toutefois en ce qui concerne les enzymes alcalins pour lesquels on note un léger décalage : en effet les phosphomonoestérases agissent à pH = 9,0 - 9,2, alors que l'optimum d'action des pyrophosphatases est déplacé à pH = 8,0 - 8,4 et même 7,4 dans le cas d'enzyme de foie.

b. L'activité pyrophosphatasique ne paraît pas liée à l'état lyo ou desmoenzyme, sauf peut-être dans le cas de la phosphatase du rein pour laquelle le vieillissement de la préparation paraît entraîner une perte notable d'activité.

Mais si l'on compare l'activité relative des pyrophosphatases de divers organes on constate les différences des optima: par extraction à l'eau distillée, le rein fournit une préparation surtout active à pH = 5,6, le foie à pH = 4,0 et l'intestin à pH = 8,0. La différence est surtout sensible dans les préparations intestinales où l'enzyme alcalin est beaucoup plus actif que l'enzyme acide.

Enfin on peut remarquer d'après les résultats donnés

dans les tableaux ci-dessus que la pyrophosphatase à pH = 5,4 est souvent masquée, en particulier dans le cas des préparations brutes de muqueuse intestinale et des préparations hépatiques non purifiées et non activées.

Ces phénomènes sont corrélatifs à l'extraction de l'enzyme ; nous avons vu en effet que dans le cas des préparations aqueuses de foie, le pH optimum 5,5 apparaît. On peut admettre que suivant le mode de préparation de l'enzyme, on se trouve en présence d'action d'inhibiteurs naturels.

c. Nous avons vu que le couple cystéine-Fe_{II} permettait de faire apparaître l'existence simultanée de trois optima très nets dans le cas des préparations de foie. De plus le fait que les pyrophosphatases ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis de ces activateurs aux différents pH, permet de prévoir l'action différente des cations sur les trois pyrophosphatases isodynames.

2. Action de certains cations (Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++}, Zn^{++}) sur les pyrophosphatases isodynames. — Nous avons vu qu'un test important pour différencier les phosphomonoestérases isodynames était l'action inégale des activateurs et des inhibiteurs. Sachant le rôle important joué par les divers cations dans l'activité des phosphomonoestérases nous avons étudié leurs effets sur les trois pyrophosphatases dont nous venons de déterminer le pH optimum d'action, espérant ainsi les différencier.

Nous avons utilisé des préparations d'organes, soumises à des dialyses prolongées, dans des conditions de pH telles qu'elles réduisent au minimum la dissociation spontanée de chaque catégorie d'enzyme. Chaque solution enzymatique est dialysée contre une solution tampon ayant un pH voisin du pH optimum d'action de l'enzyme. La dialyse est effectuée pendant cinq jours en renouvelant fréquemment le liquide de dialyse. La préparation de la solution enzymatique a été différente pour les 3 pyrophosphatases. Pour l'enzyme acide l'extraction a été faite par l'acide acétique N/40 pendant 1 heure ; l'en-

zyme à pH = 5,4 a été préparé par une autolyse de 24 heures dans l'eau distillée chloroformée à 18°. Enfin, pour la pyrophosphatase alcaline nous avons fait une extraction aqueuse de 1 heure.

TABLEAU IV. — *Action des cations : Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++}, Zn^{++} sur l'activité pyrophosphatasique de différents extraits d'organes à divers pH.*

Préparations enzymatiques dialysées, de 2 à 5 jours, contre acide acétique *N*/40 pour les essais à pH = 3,6, contre de l'eau distillée pour les essais à pH = 5,6 et contre de l'eau bicarbonatée (pH = 7,4) pour les essais à pH > 7,4.

Origine de l'enzyme	pH	Essai Témoin	Cation ajouté									
			Ca^{++}		Mg^{++}		Mn^{++}		Fe^{++}		Zn^{++}	
			γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation
Foie de Chien	3,6	187	200	+ 6	185	0	197	+ 5	142	— 24	190	+ 3
	5,6	56	48	— 14	56	0	48	— 14	32	— 50	50	— 10
	7,4	74	74	0	100	+ 36	129	+ 74	313	+319	84	+ 12
Intestin de Chien	3,6	345	345	0	292	— 15	292	— 15	199	— 53	283	— 18
	5,6	106	116	+ 9	112	+ 5	110	+ 3	106	0	114	+ 7
	8,4	294	294	0	336	+ 12	315	+ 5	378	+ 26	409	+ 36
Rein de Bœuf	3,6	120	122	+ 1	125	+ 4	122	+ 1	105	— 12	122	+ 1
	5,6	76	76	0	76	0	74	+ 2	48	— 37	76	0
	8,4	175	185	+ 5	200	+ 14	200	+ 14	240	+ 37	260	+ 37

L'hydrolyse a été faite en présence de sel de Ca (acétate), de Mg, Mn, Fe (sulfate) à la concentration de 0,001 Mol/litre) et de Zn (sulfate) à la concentration de 0,01 mMol/litre. L'hydrolyse d'une durée de 2 heures a été faite avec 2 cm^3 de solution enzymatique à cause de la perte d'activité consécutive à la dialyse. Enfin, pour plus de sûreté dans les résultats nous avons fait toutes les expériences en double.

Le tableau IV rend compte de l'action des cations sur

les trois pyrophosphatases isodynames ; on voit qu'en effet aux différences de pH optimum d'action correspondent des caractères d'activation et d'inhibition propres à chaque enzyme. A cet égard nous avons pu établir qu'il y a une limite très nette entre les pyrophosphatases « acides » et « alcalines ». Ces dernières, dans tous les organes, sont activées par les divers cations (1), d'ailleurs inégalement ; et au-dessous de pH 5,6 les pyrophosphatases sont insensibles à ces mêmes ions, sauf en ce qui concerne le Fer qui se montre inhibiteur des phosphatases acides surtout de celles de la muqueuse intestinale.

D'autre part, si l'on considère les différences d'organe à organe, on constate que les pourcentages d'activation des pyrophosphatases alcalines par les cations sont très variables : le foie fournit les préparations les plus sensibles. Les extraits de muqueuses intestinales sont déjà beaucoup moins facilement activables, et les préparations rénales, particulièrement celles obtenues suivant la technique d'Albers, sont peu sensibles. Ces différences tiennent sans doute à l'aptitude des protéines (apoenzymes) particulières à chaque organe à retenir les ions métalliques présents à l'état naturel avec des affinités différentes. Ceci expliquerait qu'un ion déterminé, Fe^{++} par exemple, active très fortement les préparations hépatiques, médiocrement l'enzyme intestinal et encore moins les extraits de reins.

C. — **Discussion des résultats.**

1. Nous avons vu qu'il était toujours possible de mettre en évidence les actions pyrophosphatasiques aux 3 pH optima, en faisant varier les conditions de leur extraction ou de leur action. La présence simultanée des trois pyrophosphatases est générale dans le règne animal et

(1) L'action de Ca^{++} sur l'enzyme alcalin est minime ou nulle dans les exemples figurant dans ce tableau. Elle nous paraît cependant faiblement inhibitrice dans le cas du produit intestinal, comme on peut s'en rendre compte par l'examen du tableau V (enzyme purifié).

probablement aussi dans le règne végétal : en effet les pyrophosphatases « acides » ont été étudiées dans l'*Aspergillus orizae* (Morii), dans les levures (Schäffner et Krumey) dans les basidiomycètes (Nguyen-Van Thoai), mais les pyrophosphatases « alcalines » existent aussi chez les végétaux, comme cela a été observé à propos des levures (Bauer).

Les résultats des expériences permettent d'établir que la valeur des pH optima est liée aux conditions d'extraction, de purification et de conservation des enzymes ; elle est indépendante de leur caractère de solubilité qui tiennent dans une certaine mesure à la nature de l'organe.

2. L'action de la cystéine sur l'hydrolyse enzymatique comparée à celle du couple cystéine-Fe_{II} peut aider à l'interprétation de la constitution des phosphatases. En effet, Cloetens, étudiant la réactivation de la phosphomonoestérase « alcaline », inactivée par dilution et élimination des ions métalliques, admet que l'apoenzyme serait accompagné de « groupements fonctionnels » indépendant de la molécule enzymatique, susceptible de fixer les cations : c'est ainsi que s'expliquerait l'action favorable des acides aminés dans l'activation de la phosphatase alacaline par Zn^{++} (Hove, Elvehjem et Hart [33]), comme celle de la cystéine dans la réactivation des peptidases par le couple cystéine-Fe_{II} (Maschmann [47]). Dans le cas particulier de la phosphatase « alcaline » nous avons observé l'activation produite par le couple cystéine-Fe_{II} alors que la cystéine seule a un effet inhibiteur : celle-ci jouerait donc le rôle de groupement intermédiaire renforçant les effets du fer.

3. Nous avons vu que les ions Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++} et Zn^{++} activent toutes les pyrophosphatases « alcalines » et sont indifférents ou même inhibiteurs en milieu acide.

On a pu remarquer, dans les expériences citées précédemment, l'action particulièrement activatrice du fer et du zinc sur les pyrophosphatases alcalines, ces métaux présentant des actions d'ailleurs différentes suivant les

organes : en effet, alors que l'activation de la pyrophosphatase hépatique par le fer est de 319 p. 100, on ne trouve plus dans le rein que 37 p. 100 et dans l'intestin 26 p. 100 d'activation. Par contre l'action du zinc est moins sensible sur l'enzyme du foie que sur ceux de l'intestin et du rein.

Les ions Mn^{++} et Mg^{++} ont aussi des actions inégales sur les trois organes, l'enzyme du foie étant le plus activé.

On retrouve la même diversité dans l'action des cations sur les pyrophosphatases « acides » : celles de l'intestin sont nettement inhibées par le fer, alors que ce cation a peu d'action sur les enzymes du foie et du rein.

Ces divergences confirment les différences des enzymes selon leur origine, problème déjà étudié par Roche, de Laromiguière et Laurens [65].

Ces faits peuvent tenir à plusieurs causes, dont l'action du pH sur les formations de complexes protido-métalliques, et la nature de ceux-ci, sont sans doute les plus importants. Ils montrent que la diversité des pyrophosphatases isodynames peut relever à la fois de différences dans la nature des apoenzymes protéiques et dans les modalités de l'action des métaux au pH optimum. Cette dualité ne doit pas être perdue de vue dans toutes les tentatives faites pour interpréter non seulement l'isodynamie des phosphatases mais aussi les phénomènes de transport de coferment de l'un à l'autre enzyme.

CHAPITRE II.

ACTION DE Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++} ET Zn^{++} SUR LA PYROPHOSPHATASE ET LA PHOSPHOMONOESTÉRASE ALCALINE.

A. — Objet et plan des recherches.

Les caractères particuliers des pyrophosphatases une fois précisés, le premier problème qui se pose à leur sujet est de savoir si la spécificité du substrat correspond à une espèce d'enzyme définie, différente des phosphomonoestérases.

Il existe entre les propriétés de ces deux groupes de phosphatases des différences (adsorbabilité, acidorésistance, thermostabilité inégales) qui ont d'ailleurs permis leur isolement. Nous avons vu que $Mg(OH)_2$ adsorbait seulement la phosphomonoestérase alcaline (Kurata), que le kaolin en milieu PO_4NaH_2 entraînait au contraire la pyrophosphatase alcaline (Takahashi) et que l'alumine C γ en milieu légèrement alcalin donnait une préparation active seulement sur l'α-glycérophosphate (Bauer). Mais on ignore tout du mécanisme de cette séparation. La disparition des autres enzymes est-elle due à leur non adsorption ou à leur dissociation en apoenzyme et coenzyme, comme tel est le cas lors de l'adsorption spécifique ?

De même l'acidorésistance inégale d'un des constituants de la lipase (Kraut et Pantschenko-Jurewicz) ou du ferment jaune (Weygand et Birkhofer) pour les deux enzymes a permis à Bamann et Gall d'isoler la pyrophosphatase acide, mais selon un mécanisme encore

mal connu, ne permettant pas d'affirmer autre chose que la spécificité d'*action* et non de nature de cet enzyme.

Ces travaux peuvent être rapprochés de ceux d'Albers, qui a réussi à fractionner l'apoenzyme et le coenzyme de phosphatases par des dialyses à différents pH (phosphatase alcaline rénale à pH = 4,8 et phosphatase acide de levure à pH = 7). Dans les deux cas il y a dégradation de l'enzyme et mise en liberté du coferment dans le liquide de dialyse. Or, Albers a remarqué que les deux coferments étaient interchangeables selon les schémas : cophosphatase de levure + apophosphatase rénale $\rightleftharpoons$ holophosphatase rénale : cophosphatase rénale + apophosphatase de levure $\rightleftharpoons$ holophosphatase de levure. Le coferment ne serait donc spécifique ni d'un organe ni d'un pH donné. Mais ces expériences n'ont été faites que dans le groupe des phosphomonoestérases et l'on ne sait rien encore sur la nature du coferment des pyrophosphatases.

Enfin la plus grande thermostabilité des pyrophosphatases a pu donner lieu à leur séparation d'avec la phosphomonoestérase (Bauer). Là encore on en est réduit à des suppositions pour savoir comment se produit la destruction des enzymes : y a-t-il coagulation par la chaleur de l'apoenzyme le moins stable ou simplement dissociation de l'enzyme ?

Les différences entre les deux enzymes sont donc certaines, mais elles pourraient aussi bien tenir à l'existence d'apoenzymes divers porteurs de groupements actifs identiques, qu'à la présence de coactivateurs nécessaires à la fixation d'un support colloïdal commun. Nous avons vu, à ce propos, le rôle de la cystéine dans l'activation de la pyrophosphatase alcaline par le couple cystéine-Fe_{II}. Pour Cloetens, les métaux seraient fixés par l'intermédiaire de groupements fonctionnels particuliers faisant partie de la molécule.

Mais quelle que soit la façon dont la molécule enzymatique est organisée, toutes les hypothèses reconnaissent le rôle important joué par les métaux. Or, d'une façon géné-

rale l'action des cations a été assez peu étudiée, surtout vis-à-vis des pyrophosphatases, exception faite de Mg^{++} à cause de son action fortement activatrice sur la phosphomonoestérase alcaline. Cette action est générale et reconnue universellement. Cependant Giri a remarqué qu'elle dépend d'un certain nombre de facteurs : âge de la préparation, degré de pureté et méthode d'extraction. C'est ainsi que Belfanti distingue dans les organes une monoestérase activable et une inhibable par Mg^{++} ce que Bamann interprète comme une forme lyo et desmoenzyme, tandis que pour Cloetens, il s'agit de deux phosphomonoestérases présentes en proportions diverses dans les tissus.

Quant à son action sur la pyrophosphatase, nous avons vu qu'elle était assez discutée et, de toute façon, beaucoup moins importante comme intensité. Mais l'action des autres cations a été assez peu étudiée.

Ca^{++} est tantôt pris pour un activateur, tantôt pour un inhibiteur, tantôt pour un corps indifférent. Selon Bamann, Ca^{++} seul serait sans effet, mais le groupe Ca^{++} + Mg^{++} serait inhibiteur ; il faudrait admettre que dans le cas d'activation par Ca^{++} il y a présence d'un corps inhibiteur proprement dit, à éliminer. Enfin, pour Bauer, il serait antagoniste de l'ion Mg^{++} en particulier sur la pyrophosphatase.

Bamann et ses collaborateurs ont noté une action activatrice, non seulement du magnésium mais aussi de Mn^{++}, Fe^{++}, Ca^{++}, Ni^{++}. Pour Tannhäuser [75], Mn^{++}, Fe^{++} et Ca^{++} sont aussi des activateurs, mais cette action des métaux n'a pas été retrouvée par Albers.

Waldschmidt-Leitz [78] a démontré que la phosphatase alcaline, inhibée par la cystéine, voit cette action diminuée en présence de Fe^{++}, mais pour del Regno [26] le système cystéine-Fe_{II} n'empêche guère l'inhibition ; Fe^{++} seul serait suivant sa concentration activateur (0,0001) ou inhibiteur (0,01 à 0,001).

D'après Hove, Elvehjem et Hart [33], les phosphatases osseuses brutes sont inhibées par Zn, l'action est

moindre sur la phosphatase rénale et nulle sur l'enzyme intestinal ; en présence de β-glycérophosphate il y a inhibition des deux premières et activation de la troisième. Dans ce dernier cas l'action de Mg^{++} s'ajouterait à celle de Zn^{++}. Mais la dialyse inverse ces phénomènes ; il y aurait donc dans les préparations brutes, des corps susceptibles de s'unir à Zn^{++} pour former des activateurs ; les aminoacides, l'alanine en particulier, jouent ce rôle de coactivateur ; l'hydrolyse de l'enzyme en présence de ces deux corps est fortement activée.

Enfin Giri [30] a étudié l'action de Cu^{++} en présence de vitamine C et d'acide déhydroascorbique : le couple Cu^{++} + vitamine C a une action inhibitrice très nette sur la phosphomonoestérase, et à un degré moindre sur la pyrophosphatase, qui protège la vitamine C contre l'oxydation ; en effet l'action de Cu^{++} + acide déhydroascorbique est nulle ; il s'agirait bien là d'un phénomène d'oxydoréduction plutôt que d'une action directe de Cu^{++} sur l'enzyme. Par contre, Courtois et M^me^ Ricaud-Manouvrier [25] ont établi que Cu^{++} s'unit à un produit d'oxydation de l'acide ascorbique en donnant un complexe doué d'un pouvoir inhibiteur très élevé vis-à-vis de la phosphomonoestérase d'amandes.

Nous voyons donc que d'une façon générale l'étude de l'action des cations a été faite dans des conditions tellement diverses qu'elle ne permet ni de généralisation ni de comparaison entre les deux groupes d'enzymes. C'est pourquoi nous nous sommes proposé d'entreprendre une étude systématique comparée, basée sur les caractères d'activation et d'inhibition de certains cations : Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++} et Zn^{++} sur la phosphatase et la phosphomonoestérase alcalines, purifiées par des dialyses prolongées.

L'action des métaux est en effet liée au degré de purification des solutions enzymatiques, en particulier à l'élimination des électrolytes. Pour cela nous avons utilisé des dialyses de 5 à 6 jours contre des solutions à pH = 7,4, pour réduire au minimum la dissociation du coenzyme et la dénaturation de l'apoenzyme. D'autre part,

pour éliminer avec plus d'efficacité les traces de métaux fixées à l'enzyme, nous avons opéré des dialyses avec des solutions de corps capables de former des complexes avec divers cations : αα'dipyridyl et diéthylthiocarbamate de Na en solution M/1000 amené pour la même raison à pH = 7,4. Les dialyses effectuées contre l'acide dioxymaléique (*) ont donné des résultats beaucoup moins démonstratifs ; celles faites contre de la cystéine ont déterminé une floculation de la solution enzymatique entraînant une grande perte d'activité. Nous avons fait ces expériences afin de préciser si la dialyse contre ces formateurs de complexes d'une part et l'intervention de cations, soit pendant la dialyse, soit au cours de l'hydrolyse, d'autre part, modifient l'activité enzymatique des pyrophosphatases et des phosphomonoestérases.

B. — **Technique.**

Nous avons adopté le mode opératoire suivant :

1. Solutions enzymatiques. — Elles ont été obtenues pour le foie et l'intestin à partir d'extraits d'organes déshydratés par l'acétone (suivant le même procédé que dans nos expériences précédentes) par traitement de 1 heure à raison de une partie de poudre d'organe pour 30 de liquide extractif ; pour le rein à partir de produits préparés et purifiés suivant la technique d'Albers (par extraction à l'eau distillée à 1 partie pour 100).

2. Dialyse. — Toutes les dialyses ont été faites à pH = 7,4 pour assurer la conservation de l'enzyme ; une partie de la solution enzymatique a été dialysée contre de l'eau distillée très légèrement bicarbonatée pendant 5 ou 6 jours (préparation A) ; une deuxième partie a été dialysée contre une solution de diéthylthiocarbamate de soude (ou αα'dipyridyl) pendant 3 jours ; dans ce cas,

(*) Nous remercions M. le Professeur Enselme de nous avoir adressé une préparation d'acide dioxymaléique utilisée pour ces essais.

le premier temps de dialyse a été suivi d'un deuxième de 3 jours, d'une part contre de l'eau bicarbonatée (préparation B), d'autre part contre une solution contenant de l'acétate de Ca, du sulfate de Mg, de Mn (Mn_{II}) et de Fe (sel de Morh) à la concentration de M/10.000 et du sulfate de Zn M/1.000.000 (préparation C).

Tous les extraits ont été ramenés en fin de dialyse à un volume tel que la teneur initiale en enzyme soit la même dans chaque série.

Ce protocole expérimental a été utilisé pour les préparations d'intestin de chien et de rein de bœuf. Les phosphatases alcalines du foie étant beaucoup trop labiles nous nous sommes contenté de dialyser les préparations hépatiques pendant deux jours contre de l'eau bicarbonatée à pH = 7,4.

3. Hydrolyse. — Elle a été faite, comme précédemment, dans des tubes jaugés à 10 cm^3 en présence de 2 cm^3 de substrat (pyrophosphate ou β-glycérophosphate de soude M/10) en présence de tampon au véronal sodique pour obtenir un pH de 7,4 à 8,4 pour les pyrophosphatases et 9,2 pour les phosphomonoestérases ; l'hydrolyse a été de 1 heure pour les préparations rénales, 2 heures pour les préparations hépatiques et 3 heures pour les extraits intestinaux. Elle a eu lieu en présence de cations : Ca^{++} (acétate), Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++} (sulfate) à la concentration de 0,001 mol/litre et sulfate de Zn : 0,01 millimol/litre. Nous avons fait de plus l'hydrolyse en présence des trois premiers et des cinq cations pour observer si l'action simultanée des métaux exerce des effets concurrentiels.

C. — Exposé des résultats.

1. Action des cations sur la pyrophosphatase et la phosphomonoestérase alcalines de préparations d'intestin de chien. — On trouvera dans le tableau V les résultats fournis par des préparations d'intestin de chien

TABLEAU V. — *Action de divers ions métalliques sur la pyrophosphatase et la phosphomonoestérase alcalines de deux préparations d'intestin de Chien dialysées dans des conditions diverses (A, B et C).*

2 cm³ de solution M/10 de pyrophosphate ou de β-glycérophosphate de Na + 4 cm³ de tampon au véronal sodique M/15 + 0,5 cm³ de solution enzymatique. Volume total : 10 cm³. Les sels de Ca (acétate), Mg, Mn, Fe (sulfates) sont à la concentration de 0,001 mol./litre et le sulfate de Zn, à 0,001 millimol./litre. Durée de l'hydrolyse : 3 h. 30. Température 37°. Chiffres en γ de P total libéré.

Préparation enzymatique obtenue par extraction d'une heure à l'eau distillée. Dialyses à pH = 7,4.

Enzyme	Réactifs ajoutés	Dialyse à l'eau bicarbonatée — Préparation A		Dialyse au diéthyldithiocarbamate de Na *M*/1000 — Préparation B		Préparation C		Dialyse à l'eau bicarbonatée — Préparation A		Dialyse à l'αα'-dipyridyl *M*/1000 — Préparation B		Préparation C	
		γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation	γ P libéré	p. 100 d'activation
Pyrophosphatase pH = 8,4	Témoin	157		367		378		294		362		294	
	Ca	178	+ 13	409	+ 11	466	+ 12	294	0	362	0	294	0
	Mg	157	0	399	+ 8	466	+ 12	336	+ 12	378	+ 5	294	0
	Mn	168	+ 6	378	+ 5	420	+ 8	315	+ 5	378	+ 5	315	+ 6
	Fe	157	0	336	— 8	399	+ 2	378	+ 26	420	+ 17	294	0
	Zn	208	+ 33	493	+ 34	509	+ 31	409	+ 36	409	+ 14	315	+ 6
	Ca+Mg+Mn...	178	+ 13	509	+ 38	540	+ 39	493	+ 75	399	+ 11	336	+ 14
	Ca+Mg+Mn+Fe+Zn	215	+ 34	719	+ 95	824	+113	509	+ 70	409	+ 14	446	+ 46
Phosphomonoestérase pH = 9,2	Témoin	493		1659		3150		619		955		1365	
	Ca	745	+ 53	2076	+ 25	2667	— 15	955	+ 52	1365	+ 42	1050	— 23
	Mg	2037	+313	4095	+147	4200	+ 33	2226	+257	2562	+165	2100	+ 53
	Mn	2079	+324	4357	+163	3990	+ 26	1974	+220	2100	+119	1848	+ 30
	Fe	304	— 38	1218	— 27	1522	— 51	450	— 19	798	— 16	462	— 66
	Zn	325	— 34	1092	— 34	1522	— 51	325	— 47	525	— 45	430	— 68
	Ca+Mg+Mn...	2037	+313	4095	+147	2990	+ 26	2226	+257	2583	+165	1869	+ 47
	Ca+Mg+Mn+Fe+Zn	1638	+230	2585	+122	3622	+ 15	1848	+191	2163	+126	1596	+ 16

dont les dialyses ont été faites comme nous l'avons indiqué ci-dessus contre des solutions de diéthylthiocarbamate de soude ou d'$\alpha\alpha'$dipyridyl.

1. On peut remarquer tout d'abord l'augmentation de l'activité enzymatique après dialyse contre des formateurs de complexe, beaucoup plus marquée d'ailleurs pour les phosphomonoestérases (230, 54 p. 100) que pour les pyrophosphatases (133, 23 p. 100).

2. D'autre part la pyrophosphatase suffisamment dialysée est en général activée par tous les ions métalliques alors que la phosphomonoestérase, inhibée par Fe^{++} et Zn^{++} subit une action activatrice beaucoup plus importante que dans le cas précédent par Mn^{++} et Mg^{++}.

3. On peut constater enfin l'action caractéristique de Ca^{++} sur les phosphoestérases ; cet ion est activateur très net des préparations A et B, et inhibiteur de la préparation C, dialysée en présence de cations.

2. Action de divers cations sur les phosphatases alcalines d'extraits de reins de bœuf. — Le tableau VI rend compte de l'activation par les métaux des enzymes provenant de reins de Bœuf purifiés suivant le procédé Albers et dialysés comme précédemment. Nous avons fait seulement une préparation A et une préparation B.

1. On peut noter que la présence des formateurs de complexe dans la dialyse entraîne une activation, moins importante toutefois que pour l'intestin, mais nous retrouvons le même phénomène en ce qui concerne leur action sur les deux enzymes : les phosphomonoestérases sont beaucoup plus activées que les pyrophosphatases. Ce fait serait dû à l'élimination d'impuretés métalliques inhibant l'action phosphatasique : on peut supposer soit que les apoenzymes des pyrophosphatases possèdent plus de métaux que ceux des estérases, soit que toutes choses égales en ce qui concerne l'élimination des métaux dans les deux cas les enzymes ne soient pas également sensibles aux cations.

2. Enfin, comme dans le cas précédent, Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++} activent fortement la phosphomonoestérase, Fe^{++} et Zn^{++} étant inhibiteurs, mais les cinq cations n'activent presque plus la pyrophosphatase.

TABLEAU VI. — *Action de divers ions métalliques sur la pyrophosphatase et la phosphomonoestérase alcalines de préparation de rein de Bœuf* (produit ALBERS).

(Dialyses à pH = 7,4. Même protocole d'hydrolyse qu'au tableau V.

Enzymes	Réactifs ajoutés	Dialyse à l'eau bicarbonatée		Dialyse au diéthyldithiocarbamate		Dialyse à l'αα' dipyridyl.	
		γ P libéré	p. 100 activation	γ P libéré	p. 100 activation	γ P libéré	p. 100 activation
Pyrophosphatase pH = 8,4	Témoin	273	0	283		304	
	Ca	273	0	283	0	336	+ 10
	Mg	231	— 15	283	0	351	+ 16
	Mn	273	0	315	+ 10	304	0
	Fe	262	— 4	283	0	304	0
	Zn	299	+ 9	283	0	372	+ 22
	Ca+Mg+Mn	273	0	262	— 6	336	+ 10
	Ca+Mg+Mn+Fe+Zn	283	+ 4	299	+ 5	351	+ 16
Phosphomonoestérase pH = 9,2	Témoin	27		44		93	
	Ca	33	+ 25	115	+162	194	+105
	Mg	92	+248	249	+538	483	+417
	Mn	85	+204	241	+466	346	+260
	Fe	traces	—100	31	— 20	75	— 19
	Zn	traces	—100	33	— 24	63	— 32
	Ca+Mg+Mn	77	+188	241	+466	283	+203
	Ca+Mg+Mn+Fe+Zn	60	+140	140	+220	239	+157

3. ACTIVITÉ DE DIVERS CATIONS SUR LES PHOSPHATASES ALCALINES DE PRÉPARATIONS HÉPATIQUES. — Par suite de la labilité des enzymes alcalins du foie, la dialyse n'a pu être prolongée plus de 48 heures, sans entraîner une perte presque totale d'activité. Nous n'avons donc pas mis en œuvre de formateurs de complexes, nous nous sommes contenté de dialyser contre une solution bicarbonatée à pH = 7,4.

Nous avons préparé les solutions enzymatiques suivant deux procédés :

1. Extraction par ammoniaque N/20 (1 gramme d'extrait de foie pour 20 de liquide extractif) pendant 1/4 d'heure, suivie d'une dialyse de 48 heures (préparation I).

2. Autolyse de 48 heures dans l'eau distillée chloroformée (1 gramme pour 20) suivie de la dialyse. Nous pourrons ainsi constater si la différence de solubilité des enzymes entraîne une différence de sensibilité aux ions métalliques.

TABLEAU VII. — *Action de divers ions métalliques sur la pyrophosphatase et la phosphomonoestérase alcalines de préparation de foie de Chien.*

Même protocole d'hydrolyse qu'au tableau V. Avec 2 cm³ de solution enzymatique. 2 heures à 37°.
Préparation I : extraction à l'ammoniaque (1 p. de poudre acétonique de foie + 20 p. AmOH) N/20 pendant 1/4 h.
Préparation II : extraction à l'eau distillée (1 p. à 20 p.) pendant 48 h.

Enzymes	Réactifs ajoutés	Préparation I		Préparation II	
		γ P libéré	p. 100 activation	γ P libéré	p. 100 activation
Pyrophosphatase pH = 7,4	Témoin.....	106	—	74	
	Ca	96	—	74	0
	Mg.....	106	—	100	+ 36
	Mn...	106	—	129	+ 74
	Fe	106	—	312	+319
	Zn	106	—	84	+ 12
	Ca+Mg+Mn	100	—	100	+ 36
	Ca+Mg+Mn+Fe+Zn..	106	—	134	+ 80
Phosphomonoestérase pH = 9,2	Témoin.....	136		432	
	Ca	252	+ 84	720	+ 66
	Mg.....	696	+409	2328	+437
	Mn.....	552	+305	1536	+255
	Fe	74	— 47	192	— 55
	Zn	129	— 5	402	— 7
	Ca+Mg+Mn	600	+390	1992	+361
	Ca+Mg+Mn+Fe+Zn..	458	+235	1200	+177

On trouvera dans le tableau VII les résultats obtenus sur les deux préparations en présence des cations : la pyrophosphatase très soluble est insensible à cette action, mais on retrouve l'activation générale par tous les métaux dans la préparation obtenue par autolyse. Fe^{++} est particulièrement activateur (319 p. 100).

Sur les pyrophosphatases l'action des ions métalliques est sensiblement du même ordre dans les deux préparations, et on retrouve comme dans les expériences précédentes la très forte activation par Mn^{++} et Mg^{++} et l'inhibition par Zn^{++} et surtout par Fe^{++}.

D. — Discussion des résultats.

1. Effet général de la dialyse. — Le pouvoir réactionnel des enzymes est lié à leur degré de pureté ; c'est pourquoi nous avons éliminé la plus grande partie des électrolytes et les traces de métaux des solutions enzymatiques par des dialyses faites contre de l'eau distillée à pH = 7,4 et contre des solutions de formateurs de complexes : αα'dipyridyl et diéthylthiocarbamate de Na ; ces corps sont peu spécifiques à ce point de vue, mais ils se combinent facilement avec de nombreux métaux : Fe, Zn, Cu, Mn entre autres. Les effets de la dialyse sont de plusieurs ordres :

a) Nous remarquons tout d'abord la différence de stabilité des solutions enzymatiques suivant leur provenance. Les préparations hépatiques perdent très vite leur activité, même en opérant à pH = 7,4 elles ne peuvent guère supporter une dialyse supérieure à 48 heures ; elles se séparent facilement de leurs ions métalliques, que ceux-ci soient de simples activateurs ou de véritables groupements actifs. C'est pour cette raison que nous n'avons pu faire intervenir pour le foie l'action des formateurs de complexe. Au contraire les préparations intestinales ont une extraordinaire résistance à la dialyse, même après six jours leur activité ne paraît pas sensi-

blement diminuée. Les préparations rénales aussi sont assez stables. Mais la seule purification obtenue par la préparation Albers est l'élimination des grosses molécules protéiques étrangères à l'enzyme. Cette technique rend d'ailleurs les préparations inaptes à l'étude de l'action des cations : en effet les protéines précipitées par l'alcool et l'acétone fixent énergiquement les traces métalliques. Ainsi Massart a trouvé une proportion de 0,005 p. 100 de Zn dans les préparations Albers, ce qui est très important, étant donnée l'activité de ce cation même à de très faibles concentrations.

b) Le résultat important obtenu par les dialyses contre des formateurs de complexes est une activation générale du pouvoir enzymatique : celle-ci serait due à l'élimination plus énergique des traces métalliques fixées à l'apoenzyme, inhibant l'action phosphatasique.

Mais cette augmentation d'activité, commune aux deux enzymes, est toujours beaucoup plus faible pour les pyrophosphatases que pour les phosphomonoestérases : quand le gain d'activité est de 133, 23, 4 et 11 p. 100 pour les premières elle atteint respectivement 230, 54, 38 et 28 p. 100 pour les deuxièmes. On peut penser, soit que les impuretés métalliques fixées à l'apoenzyme sont beaucoup plus importantes chez les pyrophosphatases, soit que les deux enzymes ont une sensibilité différente aux cations ; nous verrons d'ailleurs plus loin que l'action inégale des métaux au cours de l'hydrolyse correspondrait à un seuil de saturation efficace différent pour chaque groupe de phosphatase, l'activation toujours beaucoup plus faible des pyrophosphatases sous l'influence de la dialyse contre les formateurs de complexes répondrait à une élimination moins importante de groupements métalliques ou bien, toutes choses étant égales en ce qui concerne la vitesse d'élimination des cations, à un pouvoir réactionnel plus grand des métaux résiduels sur les pyrophosphatases que sur les phosphomonoestérases. Si l'on considère les activations spécifiques aux deux

groupes d'enzyme, obtenues par l'action des métaux au cours de l'hydrolyse, on constate qu'elles sont analogues à celles réalisées après simple dialyse, avec un peu moins d'intensité pour les enzymes intestinaux mais dans le cas du rein, les activations de la phosphomonoestérase sont beaucoup plus importantes.

Par contre, quand la dialyse contre les formateurs de complexes a été suivie, comme dans le cas des phosphomonoestérases intestinales (préparation C), d'une dialyse contre une solution riche en ions métalliques, les phénomènes d'activation par ces mêmes ions au cours de l'hydrolyse sont fortement atténués en ce qui concerne Mg^{++} et Mn^{++} ; pour Fe^{++} et Zn^{++} au contraire l'inhibition est plus forte. Le jeu des coactivateurs et la concurrence entre métaux explique l'effet inverse de certains cations, tantôt activateurs, tantôt inhibiteurs, selon les conditions de leur action, comme en témoigne de nombreuses contradictions qui se sont manifestées au cours de leur étude : ainsi Ca^{++} toujours activateur des monoestérases soigneusement dialysées devient inhibiteur des préparations riches en ions activateurs par eux-mêmes (préparation C) lesquelles sont, comme nous venons de le dire, fortement inhibées par Fe^{++} et Zn^{++}. Ces phénomènes paraissent résulter d'une plus grande affinité pour les ions inhibiteurs que pour les ions évincés : par exemple Zn^{++} est susceptible de neutraliser l'action activatrice de Mg^{++} et de Mn^{++} à une concentration 100 fois moindre.

2. Activation par les ions métalliques. — a) *Effet général.* — 1. Nous avons vu que la sensibilité des enzymes aux ions métalliques était fortement accrue par la dialyse. C'est ainsi que nous pourrons comparer l'effet des cations sur les différents organes. Leur action est en effet inégale suivant la provenance de la solution enzymatique ce qui confirmerait la diversité des phosphatases propres à chaque organe (Roche, de Laromiguière et Laurens [**64**]).

D'une façon générale les phosphatases intestinales et

hépatiques sont plus sensibles après simple dialyse à l'action des activateurs métalliques que celles du rein, pourtant dialysées plus longuement que l'enzyme du foie, ceci pouvant être dû d'ailleurs à la préparation de l'extrait d'organe.

L'action des formateurs de complexes semble entraîner pour l'enzyme une différence dans l'activation par les cations. Celle-ci paraît moindre en effet sur les phosphomonoestérases intestinales dialysées aussi bien contre le diéthylthiocarbamate que contre l'$\alpha\alpha$'dipyridyl. Cette différence est encore plus nette lorsque la dialyse a été suivie d'une seconde contre une solution riche en ions métalliques (préparation C) : les activations ne sont plus que de l'ordre de 50 p. 100 et 30 p. 100 là où elles atteignaient 300 p. 100 après simple dialyse (Mg^{++}). Ce fait n'est d'ailleurs pas surprenant, les enzymes ayant acquis par dialyse les ions activateurs métalliques, l'intervention de ces mêmes ions au cours de l'hydrolyse se manifeste d'une façon moins nette. Au contraire, en ce qui concerne les métaux inhibiteurs on peut remarquer une légère augmentation de leur action, due peut-être à un phénomène de concurrence. Nous avons déjà parlé à ce propos de l'action de Ca^{++} qui devient inhibiteur dans les préparations C.

Mais à l'inverse de l'enzyme intestinal, les phosphomonoestérases rénales sont beaucoup plus sensibles aux activateurs métalliques après dialyse contre les formateurs de complexe, surtout contre le diéthylthiocarbamate de soude : dans ce cas les effets activateurs sont plus que doublés.

Cependant, aussi bien pour les préparations rénales qu'intestinales les pourcentages d'activation des pyrophosphatases par les cations sont à peu près équivalentes dans les différentes dialyses.

2. D'après Bamann [15], l'activation par les ions métalliques, par Mg^{++} en particulier, dépendrait de l'extraction de l'enzyme. En effet, selon lui, le lyo et le desmoenzyme réagirait différemment, le premier étant beaucoup

plus sensible aux activateurs ; le support protéique, entourant le desmoenzyme jouerait en quelque sorte un rôle protecteur isolant l'enzyme.

Mais cette hypothèse ne peut être retenue pour expliquer nos résultats car les préparations A, B et C, toutes obtenues à partir du même extrait d'organe, sont inégalement sensibles aux ions métalliques.

D'autre part, la préparation I de pyrophosphatase hépatique, représentant l'état le plus soluble de l'enzyme, est à peu près insensible à l'action des cations alors que la préparation II dont l'enzyme extrait par autolyse contient une plus grande quantité de protéine subit une activation beaucoup plus importante (314 p. 100 d'activation par Fe^{++}). On ne constate donc pas une action spéciale des protéines pour empêcher l'activation.

3. Nous avons vu les effets différents des dialyses sur les pyrophosphatases et les phosphomonoestérases, les formateurs de complexes produisant une activation beaucoup plus considérable de ces dernières. On retrouve la même inégalité en ce qui concerne leur activation par les cations au cours de l'hydrolyse. Les phosphomonoestérases sont plus sensibles aux actions des métaux que les pyrophosphatases, comme dans le cas précédent. L'activation toujours beaucoup plus faible de ces dernières, peut faire envisager que les deux enzymes se distinguent par leur degré de saturation en métaux fixés à un même support colloïdal, ces métaux étant dans une certaine mesure interchangeables. Si l'énergie requise pour l'hydrolyse enzymatique est liée à une certaine somme de charge électrique, on peut admettre que celle-ci est atteinte pour un seuil de saturation de l'enzyme par les cations, plus bas dans le cas de la pyrophosphatase que celui de la phosphomonoestérase, les pyrophosphatases étant par ailleurs beaucoup moins stables que les esters ; à cet égard il convient de rappeler que les gels de terres rares hydrolysent les esters et les pyrophosphates, alors que ceux d'Al^{++}, de Zn^{++} et de Mn^{++} ne sont actifs que sur les pyrophosphates (Bamann [7]).

b. *Action particulière de chaque cation sur la pyrophosphatase et la phosphomonoestérase.* — D'après les résultats fournis par les tableaux, Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++} et Zn^{++} sont tous des activateurs de la pyrophosphatase à des degrés divers ; seuls Ca^{++}, Mg^{++} et Mn^{++} activent, plus énergiquement d'ailleurs, la phosphomonoestérase Fe^{++} et Zn^{++} se montrant des inhibiteurs de cet enzyme. Nous allons voir en détail l'action de chacun de ces ions.

Ca^{++}. — Nous avons vu combien elle était discutée dans la littérature : activateur pour certains, il serait indifférent et même inhibiteur pour d'autres. Ces controverses sont dues au mode de préparation et au degré de purification de l'enzyme. Sur des préparations suffisamment dialysées, Ca^{++} est un activateur certain des deux enzymes, mais surtout de la phosphomonoestérase. L'intervention des formateurs de complexes ne semble pas entraîner de modification notable dans son action. Mais quand celle-ci est suivie d'une dialyse contre une solution riche en cations (préparation C), Ca^{++}, toujours activateur dans les expériences précédentes, devient un inhibiteur de la phosphomonoestérase. Nous avons vu que le phénomène pourrait être attribué à un effet de concurrence, l'enzyme ayant une plus grande affinité pour les ions inhibiteurs.

Mg^{++} activateur reconnu de la phosphomonoestérase brute et incertain de la pyrophosphatase, se montre toujours, après dialyse des deux enzymes, un activateur, beaucoup plus important d'ailleurs du premier. L'activation est pour celui-ci de l'ordre de 300 p. 100. La dialyse contre les formateurs de complexes comme nous l'avons vu tend à augmenter cette activation dans les préparations rénales et au contraire à la diminuer dans les préparations intestinales. Et quand cette dialyse a été suivie d'une seconde contre une solution de cations, l'activation décroît encore (33 à 53 p. 100). La molécule enzymatique paraît en quelque sorte saturée avant l'hydrolyse.

Mn^{++} se comporte comme Mg^{++} sur les enzymes dialy-

sés contre les différentes solutions : c'est un activateur des deux enzymes mais surtout de la phosphomonoestérase. Si Albers [3] n'a pu mettre en évidence cette action c'est probablement parce qu'il a opéré sur des préparations insuffisamment dialysées et purifiées ; d'une façon générale d'ailleurs les modalités d'action des divers ions métalliques ne sauraient être considérés comme caractéristiques que dans des conditions de purification bien définies des enzymes.

Nous n'avons constaté jusqu'à présent qu'une inégalité dans l'action des cations. Fe^{++} et Zn^{++} par contre se comportent différemment sur les deux enzymes. Ce sont toujours des activateurs des pyrophosphatases dialysées, les préparations intestinales paraissant plus sensibles à l'action de Zn^{++} et les préparations hépatiques à celle de Fe^{++}. Mais les deux cations se montrent toujours inhibiteurs de la phosphomonoestérase suffisamment dialysée.

L'activation par Fe^{++} notée par Bamann sur la phosphomonoestérase hépatique a été obetnue dans des expériences non rapportées ici. Elles montrent une activation de la phosphomonoestérase par le fer de l'ordre de 50 à 100 p. 100 pour des préparations autolysées 48 heures et dialysées ou non 24 à 48 heures. Mais dans toutes nos expériences, principalement dans celles faites contre des formateurs de complexes, nous avons observé une inhibition par ce même ion ; il est probable que certains produits d'autolyse peuvent jouer un rôle dans ce phénomène : tel est le cas de la cystéine (Roche, Nguyen-van Thoai et Milhau [69]). On sait que le zinc, activateur de la phosphomonoestérase en présence d'acides aminés, est inhibiteur des enzymes longuement dialysés. C'est en présence de ces cations que l'on remarque le rôle joué par les coactivateurs. Nous avons montré en effet comment la cystéine, par exemple, pouvait inverser l'action du fer sur la pyrophosphatase acide du foie.

Les coactivateurs : cystéine pour le fer, alanine pour le zinc, auraient peut-être pour but d'organiser les positions relatives des cations dans la molécule enzymatique.

3. Conclusions. — L'ensemble des faits observés tend à montrer qu'il n'existe pas de différences fondamentales de constitution entre la phosphomonoestérase et la pyrophosphatase alcalines. La diversité des enzymes ne paraît résider, ni dans leur apoenzyme protéique, ni dans leur groupement actif, et leur spécificité de substrat ne traduit probablement pas une individualité chimique. Elle relève plutôt d'une inégalité dans le degré de saturation des deux enzymes en métaux, degré en relation directe avec l'énergie requise pour l'hydrolyse de chaque substrat et en outre du coactivateur spécifique. Ces derniers régiraient la combinaison des métaux au support colloïdal en orientant les ions vers une position privilégiée, en dehors de laquelle ils ne peuvent pas exercer d'action catalytique.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

I.

A. — Le foie, le rein et l'intestin renferment chacun trois pyrophosphatases isodynames, dont le pH optimum d'action respectif est de 3,8 à 4,0, 5,2 à 5,5 et 7,8 à 8,4. La présence de ces enzymes peut être sans doute étendue à tous les organes animaux et leur répartition semble parallèle à celle des phosphomonoestérases. La présence de ces trois enzymes n'apparaît pas sur les préparations brutes, mais elle peut toujours être mise en évidence soit en faisant varier les conditions d'extraction, soit en faisant intervenir des actions activatrices comme tel est le cas du couple cystéine-Fe pour les préparations hépatiques.

B. — La pyrophosphatase alcaline est en général activée, mais à des degrés différents, par Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++}, Zn^{++}. En particulier, Mg^{++} paraît avoir une action irrégulière : activateur de l'enzyme hépatique et intestinal, il inhibe, faiblement d'ailleurs, celui du rein. Ca^{++} est très faiblement activateur ou sans action. Quant aux pyrophosphatases acides, elles sont en général faiblement inhibées ou insensibles à ces cations.

L'action des métaux peut être modifiée par l'intervention de coactivateurs : c'est ainsi que la présence de cystéine renforce l'activation par cet ion de la pyrophosphatase alcaline du foie.

C. — La diversité des trois pyrophosphatases isodynames peut relever d'une part de différences dans leurs apoenzymes protéiques, d'autre part des modalités de l'action ou de la combinaison aux apoenzymes d'ions métalliques, au pH optimum d'action de chaque enzyme.

II.

A. — La dialyse prolongée de la phosphomonoestérase et de la pyrophosphatase alcalines provenant de préparations rénales et intestinales contre des solutions de formateurs de complexes avec les métaux (diéthylthiocarbamate de soude et αα'dipyridyl) conduit pour les deux enzymes à une activation due à l'élimination de groupements métalliques inhibant l'action phosphatasique. Cette activation est toujours beaucoup plus importante dans le cas de la phosphomonoestérase.

B. — Après dialyse, et s'il y a lieu élimination des formateurs de complexes, Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++} activent énergiquement la phosphomonoestérase et à un degré moindre la pyrophosphatase. Fe^{++} et Zn^{++}, activateurs de celle-ci, inhibent au contraire les premières. Les enzymes des préparations hépatiques, dialysées seulement 48 heures contre une solution tampon à pH = 7,4 se comportent d'une façon analogue. Dans l'ensemble la pyrophosphatase est beaucoup moins sensible aux actions activatrices que la phosphomonoestérase.

C. — En la présence ou l'absence de coactivateurs dialysables, les différences dans l'affinité des métaux pour les deux phosphatases alcalines, et en conséquence dans le degré de saturation en cations des groupements actifs, peuvent être invoqués pour expliquer, d'une part, l'action tantôt activatrice, tantôt inhibitrice des métaux selon le degré de pureté des enzymes et, d'autre part, la différence de spécificité de la phosphomonoestérase et de la pyrophosphatase alcalines.

Vu :
Le Président,
JEAN ROCHE.

Vu et approuvé :
Le Doyen,
LUCIEN CORNIL.

Marseille, le 15 Juillet 1943.
Vu et permis d'imprimer :
Aix, le 26 Juillet 1943.
Le Recteur,
PIERRE MARTINO.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Albers (H.) et (E.). — Ueber die Phosphatasen der Hefe. *Zt. f. physiol. Chem.*, 1935, **235**, 47.
2. Albers (H.), Beyer (E.), Bohnemkamp (A.), und Müller (G.). — Ueber die zusammengesetzte Natur der Fermente. *Berichte dtsch. chem. ges.*, 1938, **71**, 1913.
3. Albers (D.). — Ueber sogenannten Aktivatoren der alkalischen Phosphatasen. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1940, **266**, 1.
4. Albers (D.). — Die Trennung der Phosphatasen in Protein und prostetische Gruppe. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1939, **261**, 43.
5. Albers (H.) und Albers (E.). — Ueber die Phosphatasen der Hefe. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1935, **235**, 47.
6. Albers (H.). — Die Phosphatasen, in Handbruch der Enzymologie, 2 vol., 1545 p., Akad. Verlagsges Liepzig, 1940.
7. Bamann (E.). — Ueber phosphatatische Wirkungen von Hydrogelen. *Ztschr. f. angew chem.*, 1939, **52**, 186.
8. Bamann (E.) und Diederichs (K.). — Trennungs der beiden isodynamen Phosphoesterasen tierischen Organe durch ein selktives Inaktivierungsverfahren. *Berdeutsch. Chem. Ges.*, 1934, **67**, 2019.
9. Bamann (E.) und Gall (H.). — Auffindung isodynamen, Pyrophosphatasen und ihre Kennzeichnung. *Biochem. Ztschr.*, 1937, **293**, P.
10. Bamann (E.), Heumuller (E.), Werner (H.) und Carl (A.). — Cité dans Methoden der Fermentforschung von Bamann E. und Myrbäk K., Leipzig, 1941, 1669 II.
11. Bamann (E.) und Henmüller (E.). — Ueber die Aktivierung von Phosphatasen durch verschiedener Metallionen *Naturwiss*, 1940, **28**, 535.
12. Bamann (E.) und Riedel (E.). — Ueber das Vorkommen zweier durch das Wirkungsoptimum unterscheidbaren Phosphoesterasen in tierischen Organen. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1934, **229**, 125.
13. Bamann (E.) und Salzer (W.). — Die Phosphatase aus Aspergillus orizae als chemisch isodynamen Phosphoesterasen, *Biochem. Ztschr.*, 1939, **287**, 380.

14. Bamann (E.) und Salzer (W.). — Ueber das Vorkommen eines zweiten im saurem Gebiet wiksamen Phosphoesterasen in tierischen Organen. *Biochem. Ztschr.*, 1936, **286**, 147.
15. Bamann (E.) und Salzer (W.). — Lyo und Desmoenzyme. *Ergb. der Enzymfcasch.*, 1938, **7**, 46.
16. Barrenschen (H. K.) und Lang (S.). — Zur Kenntniss der Adenosintriphosphatase der Leber. *Biochem. Ztschr.*, 1932, **253**, 395.
17. Baudoin (J.). — Sur les phosphatases animales acides. *Thèse Doct. Pharmac. Etat*, Marseille, 1943, 1 vol., 101 p., Imp. Declume, Lons-le-Saunier.
18. Bauer (E.). — Trennung von Glycerophosphatase und Pyrophosphatase aus Unterhefe. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1936, **239**, 195.
19. Belfanti (S.), Contardi (A.), and Ercoli (A.). — Researches on the phosphatases. II. Inactivation and reactivation of the phosphatases of animal organs. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 842.
20. Belfanti (S.), Contardi (A.) and Ercoli (A.). — Studies on the phosphatases. I. The influence of some electrolyte on the phosphatases of animal tissue. Phosphatases of the liver, Kidney, serum and bones of rabbit. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 51.
21. Cloetens (R.). — a) Ueber den Aktivierungmechanismus der alkalischen Phosphatase. II. durch Metallionen. *Biochem. Ztschr.*, 1941, **307**, 252.
b) Reversible Abspaltung der zweitens Metalles der alkalischen Phosphatasen. II. *Biochem. Ztschr.*, 1941, **308**, 37.
c) Eigenschaften der alkalischen Phosphatasen II mit verschiedene M_1 und der M_2 frein Apophosphatasen. *Biochem. Ztschr.*, 1941, **310**, 42.
22. Courtois (J.). — Recherches sur les phosphatases végétales. Thèse Doct. de phys. Paris 1938, 1 vol., 205 p., Declume éditeur, Lons-le-Saunier.
23. Courtois (J.) et Rabatté (J.). — Action du phlorizozide et de quelques hétérosides voisins sur la phosphatase reinale. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 184.
24. Courtois (J.) et Biget (P.). — In Biget (P.). Recherches sur la phosphatase urinaire. Thèse doc. Pharm., Paris, 1943.
25. Courtois (J.) et Ricaud-Manouvrer (J.). — In Ricaud-Manouvrier (J.). — Recherches sur la phosphatase d'amande. Thèse doct. Pharm., 1943, Paris, 109 p., imp. de la Cour d'Appel édit.
26. Del Regno (F.). — Azione della Cisteina dei Fe^{++} e del sistema cisteina Fe^{++} sulla Fosfatasi alcalina. *Arch. di Sc. biolog.*, 1938, **24**, 532.
27. Erdtman (H.). — Ueber Nierenphosphatase und ihre Aktvierung. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1928, **177**, 211.

28. Fleury (P.) et Courtois (J.). — Recherches sur les pyrophosphatases végétales. II. Activité glycérophosphatasique et pyrophosphatasique de diverses préparations d'amandes. *Enzymol.*, 1938, **5**, 524.
29. Folley (S. O.) et Kay (H. D.). — The phosphatases Erg. Enzym. Forsch., 1936, **5**, 159.
30. Giri (K. V.). — Ueber Pflanzenphosphatasen. I. Die Phosphatasen gekeimter Sojabohnen (Glucine hispida). *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1937, **245**, 185.
31. Gulland (J. M.) and Jackson (E. M.). — Phosphoesterases of bone and snake venoms. *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, 590.
32. Horii. — Cité d'après Oppenheimer.
33. Hove (E.), Elvehjem (C. A.), Hart (E. B.). — The effect of zink on alcaline phosphatases. *Journ. of biol. Chem.*, 1940, **134**, 425.
34. Ignatieff (V.). — A note on the relative distribution of phosphorus and phosphatase activity in the floral parts of Nicotiana affinis petunia Salfiglosis and gladiolus. *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, 1815.
35. Imagawa. — Cité d'après Folley et Kay.
36. Ichihara (M.). — Ueber die Phosphoamidase. *Journ. of Biochem.*, 1933, **18**, 87.
37. Jacobsen (E.). — Ueber eine spezifische Adenylpyrophosphatase. *Biochem. Ztschr.*, 1931, **242**, 292.
38. Jenner (H. D.) and Kay (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues. III. Magnesium and the phosphatase system. *Journ. of Biochem.*, 1931, **93**, 733.
39. Kay (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues. II. Pyrophosphatases. *Biochem. Journ.*, 1928, **22**, 1446.
40. Keeser. — Cité d'après Oppenheimer.
41. Kuwabara. — Einfluss des Ca auf Knorpelphosphatase. *Journ. of Biochem.*, 1932, **16**, 403.
42. Kurata. — Ueber die fermentative Spaltung der Diphenylpyrophosphosaure. *Journ. of Biochem.*, 1931, **14**, 25.
43. Kutscher (W.) und Wörner (A.). — Prostataphosphatase. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1939, **52**, 46.
44. Laromiguières (S. de). — Le système phosphatasique de l'intestin. Thèse doc. pharm. Marseille, 1942, 1 vol., 108 p. Imp. Declume édit., Lons-le-Saunier.
45. Laurens (A.). — Sur les activateurs et les inhibiteurs des phosphatases alcalines. Thèse doc. Pharm. Marseille, 1942. 1 vol., 111 p. Imp. Declume édit., Lons-le-Saunier.
46. Liebnecht (W. L.). — Ueber die Aufspaltung der Adenylpyrophosphosaure durch Knochenphosphase. *Biochem. Ztschr.*, 1939, **303**, 96.
47. Maschmann (E.). — Ueber Bakterienproteasen. *Biochem. Ztschr.*, 1940, **307**, 1.
48. Massart (H.) und Vandendriesche (L.). — Aktivierung und Hemmung des Phosphatasen. *Natur*, 1940, **28**, 1943.

49. Massart (L.) et Dufait (R.). — Ueber die KCN und NaF Hemmung der Gärung mit besonderem Berücksichtigung der Metalle als Aktivatorem der Fermente. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1942, **272**, 157.
50. Mayer (K.) und Klinga-Mayer (M.). — Ueber das Stärkeverflüsssigunggsvermögen während der Keimung der Gertes. *Ztsch. f. physiol. Chem.*, 1941, **287**, 115.
51. Morii (M.) und Takabatake (Y.). — Phosphatasen menschlichen Uteringeschwülste. *Arb. 3 Abt. Anat. Inst. Kyoto* CN° 3, 1932, 46.
52. Munemura (S.). — Ueber den Einfluss der Elektrolyten auf die Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase. *Journ. of Biochem.*, 1927, **8**, 205.
53. Neuberg (C.) et Wagner (J.). — Zur Kenntnis der Phosphatase und über die Darstellung von sauren Ester der Pyrophosphosaüre. *Biochem. Ztschr.*, 1926, **171**, 485.
54. Neuberg (C.) et Jacobson (K. P.). — Fortgesetzte Untersunchungen über den Wirkunsbericht der Phosphatase. *Biochem. Ztschr.*, 1928, **199**, 498.
55. Neuberg (C.) et Fischer (H. A.). — Enzymatische Spaltung anorganische Triphosphosaüre. I. *Enzym.*, 1937, **2**, 191.
56. Nguyen-van Thoai. — Recherches sur les phosphatases végétales. II. Le système pyrophosphatasique des basidiomycètes. *Bull. soc. chim. biol.*, 1941, **23**, 1277.
57. Nguyen-van Thoai. — Recherches sur les phosphatases végétales. II. Caractères des préparations enzymatique de soja ou d'amandes douces. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1369.
58. Ochai (E.). — Gewinnung und enzymatische Hydrolyse von *l* und *d*, *l*-difenchylpyrophosphosaüre. *Biochem. Ztschr.*, 1932, **253**, 180.
59. Ohmiya (S.). — Ueber die fermentative Hydrolyse der Hexosediphosphosäurester. *Journ. of Biochem.*, 1933, **18**, 125.
60. Oppenheimer (C.). — Die Fermente und ihre Wirkungen Supplement Lief 1-2, 1935 W. Junk édit., La Haye, 1933.
61. Rappoport (S.), Leva (E.) et Guest (G. M.). — Phytase in plasma and erythrocytes of various species of vertebrates. *Journ. of biol. Chem.*, 1941, **139**, 621.
62. Robison (R.). — Bone Phosphatase. *Ergbn. d. Enzym. forsch.*, 1932, **1**, 280.
63. Roche (J.). — Blood Phosphatases. *Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 1724.
64. Roche (J.) et Baudoin (J.). — Sur les phosphatases du foie. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 245.
65. Roche (J.), Laromiguières (S. de) et Laurens (A.). — Sur la diversité des phosphatases alcalines. Les phosphomonoestérases et pyrophosphatases dans les organes animaux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 1157.

66. Roche (J.), Laromiguières (S. de) et Laurens (A.). — Sur le système phosphatasique de l'intestin, ses activateurs et ses inhibiteurs. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 1019.
67. Roche (J.), Nguyen-van Thoai et Baudoin (J.). — Phosphomonoestérase et pyrophosphatase acides isodynames. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1247.
68. Roche (J.) et Nguyen-van Thoai. — Sur l'activation et l'inhibition de diverses phosphatases par l'ion Mg. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 1337.
69. Roche (J.), Nguyen-van Thoai et Milhau (O.). — Action du couple cystéine-Fe sur les phosphatases. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, sous presse.
70. Schäffner (A.) und Bauer (E.). — Ueber Hefephosphatase. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1935, **232**, 66.
71. Schäffner (A.) und Krumey (F.). — Ueber die Phosphatasen der Hefe. *Ztschr. f. physiol. chem.*, 1938, **255**, 145.
72. Satoh (T.). — Ueber die Hydrolyse der Adenosintriphosphosaüre durch Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase. *Journ. of Biochem.*, 1935, **21**, 19.
73. Suzucki, Yoshimura et Takamishi. — Imp. univ. Coll. Agric. Bull., (Tokyo) 1907, 7, 503. Cité d'après Folley (S. J.) et Kay (H. D.).
74. Takahashi (H.). — Pyrophosphatase. *Journ. of Biochem.*, 1932, **16**, 463.
75. Tannhäuser (S. J.), Riedel (M.) and Grattan (J. F.). — Action of ascorbic acid on plasma phosphatase. *Journ. of biol. Chem.*, 1937, **121**, 697.
76. Tapadinhas (J.). — Recherche sur la spécificité de la phosphatase des feuilles vertes. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **105**, 811.
77. Waldschmit-Leitz (E.) und Kohler (E.). — Zur Spezifität der Tierenphosphatase. *Biochem. Ztschr.*, 1933, **258**, 360.
78. Waldschmidt-Leitz (E.), Sharikova, und Schäffner (A.). Ueber der Einfluss von Sulfhydrylverbindungen auf enzymatische Prozesse. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1933, **214**, 75.

TABLE DES MATIÈRES.

PREMIÈRE PARTIE.

I. — Les pyrophosphatases dans le cadre général des phosphatases 9

A. Spécificité du substrat 10

1. Nature de l'alcool 10

2. Influence de corps liés aux restes phosphoriques 10

3. Nature du groupement acide 11

B. pH optimum d'action 12

C. Activateurs et inhibiteurs 13

II. — Etude générale des pyrophosphatases 15

A. Répartition dans la nature 15

1. Pyrophosphatases animales 15

2. Pyrophosphatases végétales 15

B. Caractères des pyrophosphatases 16

1. pH optimum d'action 16

2. Activateurs et inhibiteurs 17

3. Spécificité du substrat 22

C. Différenciation des pyrophosphatases et des phosphomonoestérases 24

1. Séparation 24

a) Adsorption 25

b) Destruction thermique 25

c) Séparation par action des ions H^+ et OH^- 26

2. Différence d'activation et d'inhibition 26

3. Sur quoi reposent ces différences 28

III. Objet du travail 32

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches personnelles.

CHAPITRE I. — CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES PYROPHOSPHATASES ISODYNAMES 35

A. *Technique* 37

1. Préparation des enzymes 37

a) Conservation des organes 37

b) Préparation des solutions enzymatiques 38

c) Dialyse 38

2. Hydrolyse 39

3. Dosage 39

B. *Exposé des résultats* 39

1. Mise en évidence des pyrophosphatases

a) Activité pyrophosphatasique de préparations de reins de bœufs en fonction du pH 40

b) Activité pyrophosphatasique de préparations d'intestins de chien en fonction du pH 41

c) Activité pyrophosphatasique de préparations de foie de chien en fonction du pH 42

d) Activité pyrophosphatasique de préparations de foie de chien en fonction du pH, en présence du couple cystéine-fer 42

e) Activité pyrophosphatasique de préparation de foie de chien dialysé en présence de Mg^{++} et du couple cystéine-fer 44

Conclusions 45

2. Action de certains cations (Ca, Mg, Mn, Fe, Zn) sur les pyrophosphatases isodynames 46

C. *Discussion des résultats* 48

CHAPITRE II. — ACTION DE Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++} et Zn^{++} SUR LA PYROPHOSPHATASE ET LA PHOSPHOMONOESTÉRASE ALCALINES 51

A. *Objet et plan des recherches* 51

B. *Techniques* 55

1. Solution enzymatique 55

2. Dialyse 55
3. Hydrolyse 56
C. *Exposé des résultats* 56
1. Action des cations sur la pyrophosphatase et la phosphomonoestérase alcaline de préparations d'intestin de chien 56
2. Action de divers cations sur la pyrophosphatase et la phosphomonoestérase alcalines de préparations de reins de bœuf 58
3. Action de divers cations sur les phosphatases alcalines de préparations hépatiques 59
D. *Discussion des résultats* 61
1. Effet général de la dyalyse..... 61
a) Différence de stabilité des solutions enzymatiques 61
b) Activation du pouvoir enzymatique 62
2. Activation par les ions métalliques... 63
a) Effet général 63
b) Action particulière de chaque cation sur la pyrophosphatase et la phosphomonoestérase..... 66
3. Conclusion 68

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES..... 69

Bibliographie 71

Table des matières 77

M. Declume, imprimeur, Lons-le-Saunier (31.2160).